

Aus der Klinik für Kleintiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der
Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz

Eine histologische und histomorphometrische Studie am Tiermodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Doreen Nöbel
aus Meerane

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Vera Grevel
Prof. Dr. Werner Hein

Gutachter: Prof. Dr. Vera Grevel, Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
Prof. Dr. Werner Hein, Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon, Institut für Veterinärpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
Prof. Dr. Hans-Jürgen Pesch, Pathologisches Institut der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen

Tag der Verteidigung: 5. Dezember 2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Biologie des Knochengewebes	3
2.1.1	Funktionelle Anatomie des Knochens	3
2.1.2	Mineralisation von Knochengewebe	6
2.1.3	Reaktionen des Knochens auf Defekte	7
2.1.4	<i>Remodeling</i>	8
2.2	Knochenersatzstoffe	9
2.2.1	Einteilung der Biomaterialien und Definitionen	10
2.2.2	Eigenschaften von Keramiken für den Knochenersatz	11
2.2.3	Calciumphosphatkeramiken und ihre Anwendung als Beschichtungsmaterial	12
2.3	Resorbierbarkeit/ Löslichkeit und biologische Reaktionen auf Calciumphosphatkeramik-Beschichtungen im Knochengewebe	15
2.3.1	Resorbierbarkeit/ Löslichkeit	15
2.3.2	Einheilung beschichteter Implantate in den Knochen	16
2.3.3	Oberflächengestaltung von Implantaten im biologischen Kontext	18
2.3.4	Nachteile von Hydroxylapatitbeschichtungen	19
2.4	Das Tiermodell	19
3	Tiere, Material und Methoden	21
3.1	Tiere und Implantatmaterialien	21
3.1.1	Tiere und Tierhaltung	21
3.1.2	Implantate und Beschichtungen	22
3.2	Versuchsaufbau	24
3.2.1	Einteilung der Versuchsgruppen	24
3.2.2	Operation	24
3.2.3	Postoperative Versorgung und Kontrolle	26
3.2.4	Polychrome Sequenzmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	26
3.2.5	Probenentnahme und Aufbereitung	27
3.3	Herstellung von Dünnschliffen für Histologie und Histomorphometrie	28
3.3.1	Entwässerung und Einbetten der Knochenproben	28
3.3.2	Herstellung von Dünnschliffen	29
3.4	Histologische Oberflächenfärbungen, Lichtmikroskopie und Histomorphometrie	31
3.4.1	Histologische Färbungen	31
3.4.2	Lichtmikroskopie	32
3.4.3	Histomorphometrie	33

3.5	Statistik	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Versuchsverlauf	36
4.2	Histologische Beurteilung der Schliffpräparate im zeitlichen Kontext	37
4.2.1	Implantate mit GB14 Beschichtung	37
4.2.2	Implantate mit 602020 Beschichtung	45
4.2.3	Implantate mit FA-CZP Beschichtung	55
4.2.4	Implantate mit Ca4Ti3O10 Beschichtung	63
4.2.5	Implantate mit Hydroxylapatitbeschichtung	68
4.2.6	Unbeschichtete Ti6Al4V Implantate	71
4.2.7	Zusammenfassung der histologischen Beurteilung der Schliffpräparate	74
4.3	Histomorphometrische Ergebnisse	75
4.3.1	602020- und GB14 Beschichtungen im Vergleich zur HA Beschichtung	75
4.3.2	FA-CZP Beschichtung im Vergleich zur HA Beschichtung	82
4.3.3	Calciumtitanat Beschichtung im Vergleich zu Ti6Al4V Implantaten	85
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	88
5	Diskussion	90
6	Zusammenfassung	100
7	Summary	102
8	Literaturverzeichnis	104
9	Lebenslauf	

Verzeichnis der Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destillata
<i>ASTM</i>	American Society for Testing and Materials
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung
<i>BCA</i>	Bonelike Carbonated Apatite
<i>BMP</i>	Bone Morphogenic Protein
BV/TV	Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes
CaTi	Calciumtitanat
Ca ₄ Ti ₃ O ₁₀	Calciumtitanat
FA-CZP	Fluorapatit-Calciumzirkonphosphat
GPa	Gigapascal
HA	Hydroxylapatit
<i>HLS</i>	Hue Lightness Saturation (Farbintensität, Helligkeit, Sättigung)
<i>ISO</i>	International Organization for Standardization
KM	Körpermasse
Kont.	Implantatkontaktfläche
Kont_Be_Os	Kontaktfläche Beschichtung Knochen
Kont_Be_Osteoid	Kontaktfläche Beschichtung Osteoid
Kont_Met_Os	Kontaktfläche Metall Knochen
Kont_Met_Osteoid	Kontaktfläche Metall Osteoid
MLU	Martin-Luther-Universität
MMA	Methylmethacrylat
MPa	Megapascal
Osteoid/Os	Mineralisierungsgrad
post impl.	post implantationem
post op.	post operationem
R	Resorbierbarkeit
R _a	„average“ (= mittlere) Rauigkeit
RANKL/RANK	Receptor for Activation of Nuklear Kappa-B Ligand/ Receptor for Activation of Nuklear Kappa-B
<i>RGB</i>	Red Green Blue (Rot Grün Blau), Echtfarbmodus
<i>ROI</i>	Region of Interest
<i>SBF</i>	Simulated Body Fluid
TCP	Tricalciumphosphat
Ti6Al4V	Titanlegierung (6% Aluminium, 4% Vanadium)
Wo	Wochen

1 Einleitung

Mit der Optimierung von Operationsverfahren und Implantaten wird eine Verbesserung der klinischen Möglichkeiten des Ersatzes kranker und zerstörter Gewebe von Patienten angestrebt. Für den Knochenersatz spielt - neben der Erforschung und Entschlüsselung der Heilungsprozesse auf molekularer Ebene - die Entwicklung neuer Implantatmaterialien eine entscheidende Rolle. Derartige Materialien müssen zahlreiche werkstofftechnische und biologische Anforderungen erfüllen. So sollten sie die mechanische Funktion des zu ersetzenden Knochengewebes möglichst sofort wieder herstellen und gleichzeitig die Knochenneubildung fördern.

Die Fixierung von Implantaten im Knochengewebe, die Voraussetzung für deren mechanische Belastbarkeit ist, kann entweder mittels Knochenzement als Haftvermittler oder über *press fit* Verankerung realisiert werden. Die Verwendung von Knochenzement ist mit zahlreichen Problemen, wie Alters- und Korrosionserscheinungen, behaftet. Bei der zementlosen *press fit* Technik müssen Prothesen über geeignete Oberflächenstrukturierungen verfügen, damit eine biologische Befestigung des Werkstoffes im Knochengewebe stattfinden kann. Dieser, als Osteointegration bezeichnete, Prozess ist die Voraussetzung für die Überführung der intra operationem erreichten Primärstabilität eines Implantats in eine definitive oder Sekundärstabilität.

Eine Möglichkeit der „knochenfreundlichen“ Oberflächengestaltung ist die Beschichtung kraftaufnehmender metallischer Grundkörper mit Calciumphosphatkeramiken. Solche Keramiken gelten als bioaktiv, das heißt sie fördern die Differenzierung von Knochengewebe und können mit diesem eine direkte chemisch-biologische Verbindung eingehen. Als Beschichtungsmaterial sollen sie die Einheilung von Implantaten beschleunigen und der Prothese zu einer belastungsfähigen Verankerung im Knochen verhelfen. Breite Anwendung in der Implantologie hat die Hydroxylapatitbeschichtung gefunden.

Die chemische Zusammensetzung des Beschichtungsmaterials, seine Haftfestigkeit an der Trägersubstanz (Metall), die Beschichtungsdicke sowie resorptive Vorgänge innerhalb der Beschichtung beeinflussen die Reaktion des Knochengewebes auf die Keramikbeschichtung und somit die klinische Anwendbarkeit beschichteter Implantate. Über die optimale bzw. notwendige chemische Stabilität von Keramikbeschichtungen im knöchernen Lager bestehen Kontroversen. Langzeitstabile Calciumphosphatkeramiken wie Hydroxylapatit bieten die Möglichkeit, dem Wirtsgewebe Knochen ihre bioaktive Oberfläche über einen langen Zeitraum hinweg zur Verfügung zu stellen. Dabei bleibt jedoch offen, ob und wenn ja, welche Nachteile mit der langjährigen Persistenz solcher Materialien im Organismus verbunden sein können. Calciumphosphatkeramiken mit erhöhter Abbaubarkeit stimulieren die Knochenneubildung u. U. stärker als langzeitstabile. Wenn der Keramiküberzug eines Implantats resorbierbar gestaltet ist, muss jedoch geprüft werden, ob nach Verschwinden der Keramikbeschichtung der Substanzverlust durch Knochengewebe ersetzt werden kann und so auch der metallische Grundkörper osteointegriert wird.

In der vorliegenden *in vivo* Studie sollen vier verschiedene Keramikbeschichtungen auf Grundkörpern einer Titanlegierung (Ti6Al4V) auf ihre grundsätzliche biologische Eignung als Implantatbeschichtungen untersucht werden. Die Beschichtungsmaterialien unterscheiden sich in chemischer Zusammensetzung, Resorbierbarkeit und Schichtdicke. Dem Einfluss dieser Parameter auf die Osteointegration soll dabei besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Zu diesem Zweck wird die Einheilung dieser Implantate in den Knochen qualitativ histomorphologisch und quantitativ histomorphometrisch beurteilt.

Verlässliche Aussagen zur knöchernen Integration von Implantaten sind derzeit nur durch histologische Untersuchung von Gewebeproben möglich. Deshalb muss immer noch aus Ergebnissen histologisch aufgearbeiteter Proben aus dem Tierexperiment auf die klinische Anwendung extrapoliert werden. SOOST (2001) formulierte die Zielstellung solcher Studien folgendermaßen: „Die Dynamik der Knochenreaktion auf die Implantation von Knochenersatzmaterialien soll im Tierversuchsmodell anhand objektivierbarer Methoden untersucht werden, um trotz aller gebotenen Zurückhaltung in der spezieübergreifenden Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse Aussagen über spezifische Eigenschaften der einzelnen Materialien zu treffen und so Diskussionsgrundlagen für mögliche Indikationen der klinischen Anwendung zu schaffen.“

2 Literaturübersicht

2.1 *Biologie des Knochengewebes*

2.1.1 *Funktionelle Anatomie des Knochens*

Knochen gehört zu den Binde- und Stützgeweben und besteht als solches aus gewebsspezifischen zellulären Komponenten und extrazellulärer Matrix. Als hoch spezialisiertes Gewebe übernimmt Knochen innerhalb des Organismus im Wesentlichen drei Hauptfunktionen (LIEBICH 1993, AMLING 2003):

- Knochen bilden das Skelett und sind damit für Formgebung, Mobilität und mechanische Belastbarkeit des Organismus verantwortlich.
- Sie bieten Schutzfunktion für lebenswichtige Organe und beherbergen das Knochenmark.
- Als Calcium- und Phosphorspeicher ist der Knochen an der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase beteiligt.

Aufrechterhaltung und Modulation von Form und Funktion dieses Gewebes sind das Ergebnis zellulärer Leistungen.

2.1.1.1 Zelluläre Elemente

Osteoblasten

Pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma (=mesenchymale Stammzellen) können sich unter anderem zu Osteoblasten differenzieren. Osteoblasten sind nicht teilungsfähige Endzellen, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind. Sie sezernieren die unverkalkte Knochenmatrix (Osteoid) und sind an der Mineralisation des Knochengewebes beteiligt (AMLING 2003). Osteoblasten liegen der Knochenoberfläche direkt auf und bilden dort einen einschichtigen epithelartigen Verband, der durch einen schmalen Osteoidsaum von reifem mineralisierten Knochen getrennt ist. Sie nehmen verschiedene Formen an, die als Indikator für die Aktivität der Zellen angesehen werden (MATTHEWS 1980, NIJWEIDE 1986). Aktive Osteoblasten produzieren pro Tag einen etwa 1 µm breiten Osteoidsaum, dieser wird an der dem Knochen zugewandten Seite abgeschieden und mineralisiert bei Menschen innerhalb von ca. 10-15 Tagen. Inaktive Osteoblasten liegen in abgeflachter Form als sog. *Lining cells* der Knochenoberfläche auf und sind über *gap junctions* untereinander und mit Osteozyten verbunden (BARTL und FRISCH 1993, AMLING 2003).

Osteozyten

Osteozyten stellen den häufigsten Zelltyp innerhalb des Knochens. Sie stehen am Ende der Differenzierung der Osteoblastenzelllinie. Osteoblasten, die in die von ihnen sezernierte Matrix vollständig eingeschlossen werden, entwickeln sich zu Osteozyten. Im Laufe dieses Prozesses werden die Zellen schmäler, verlieren einen Teil ihrer Zellorganellen und auch die Expression charakteristischer Markerproteine ändert sich (KAISER und DELLING 2002).

Über dendritische Fortsätze, die in ihrer Gesamtheit ein Synzytium bilden, haben die Knochenzellen untereinander innerhalb der mineralisierten Matrix, zu den Osteoblasten der Oberfläche bzw. den *Lining Cells*, den Stromazellen des Knochenmarks und den Endothelzellen Kontakt. Osteozyten liegen in Lakunen (Osteozytenhöhlen), deren Wände von der mineralisierten Matrix gebildet werden und die nur unvollständig vom Zellkörper ausgefüllt werden (MATTHEWS 1980). Die Fortsätze sind in sog. Canaliculi lokalisiert. Die Eigenschaften dieses Systems bilden die Grundlage der Modulation von externen Signalen in lokale Anpassungsvorgänge (Knochenwachstum, *Modeling*, *Remodeling*) innerhalb des Knochens (BURR et al. 2002).

Osteozyten sind für die Lebensfähigkeit des Knochens essentiell (LIEBICH 1993). Ihre Darstellbarkeit mittels histologischer Färbungen gilt als Zeichen von Vitalität, leere Lakunen sprechen hingegen für Knochennekrosen (BARTL und FRISCH 1993).

Osteoklasten

Osteoklasten sind 50 bis 100 µm große Zellen mit zwei bis zehn Zellkernen. Sie entstehen durch asynchrone Fusion mononukleärer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Ihre Differenzierung erfolgt aus der Granulozyten- Makrophagenlinie (OWEN 1980, CHAMBERS 1989, PRALLET und MALE 1992, AMLING und DELLING 1998). Osteoblasten und Osteoklasten stammen also nicht von der gleichen Vorläuferzelle ab.

Zellspezifisch für die Osteoklasten ist ihre Fähigkeit zur Knochenresorption. Sie sind dabei in der Lage sowohl die mineralischen als auch die organischen Anteile der Matrix zu resorbieren (MATTHEWS 1980, AMLING und DELLING 1998). Dazu heftet sich der Osteoklast an die Knochenoberfläche an und die Zellmembran der dem Knochen zugewandten Seite wird zu einem Bürstensaum, der sog. *ruffled border*, aufgefaltet. Zur Umgebung wird so ein Resorptionskompartiment abgeschrmt (KORNAK et al. 2003). Zur Auflösung des Knochenapatits muss der pH-Wert innerhalb der Resorptionszone auf ca. vier abgesenkt werden. Zu diesem Zweck bildet der Osteoklast mit Hilfe von Carboanhydrase H^+ Ionen, die in die Resorptionslakune gepumpt werden. Zusätzlich gelangen über die Verschmelzung von Vesikeln mit dem Bürstensaum Proteasen in die Resorptionslakune, die ebenfalls nur im sauren Milieu aktiv sind und die Knochenmatrix abbauen (DIETSCH 2004).

Mit dem Substanzverlust entsteht auf dem Knochen eine konkave Oberflächenformation - die *Howship'sche Lakune* -, die als charakteristischer Aufenthaltsort für diesen Zelltyp gilt (AMLING 2003).

Obwohl Osteoklasten und Osteoblasten scheinbar gegensätzlich wirken, werden Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten über das RANKL/RANK/Osteoprotegerin System von den Osteoblasten gesteuert. Auch umgekehrt findet eine Anpassung der Osteoblastenaktivität über Gewebshormone statt, die durch Osteoklasten bei der Knochenresorption freigesetzt werden (KORNAK et al. 2003).

2.1.1.2 Interzellulärsubstanz

Organische Bestandteile

Die Interzellulärsubstanz des Knochens besteht aus organischer Matrix und anorganischen Bestandteilen. Den Hauptanteil nehmen dabei die Kollagenfibrillen ein (Tab.1), diese liegen innerhalb der unverkalkten Knochenmatrix (Osteoid) noch ungeordnet vor (LIEBICH 1993) und organisieren sich später (im Verlauf der Mineralisation und Knochenreifung) zu typischen Lamellensystemen.

Tab.1: Organische Bestandteile des Knochens nach POLLARD und EARNSHAW (2002)

Protein	Anteil	Funktion
Kollagen Typ I	90 %	Bildung der Fibrillen der Matrix
Osteocalcin	1-2 %	Bindung an HA und Ca^{2+}
Osteonectin	2 %	Synthese bei Knochenentwicklung und -regeneration, Bindung an HA und Kollagen; Förderung von Kristallisationskeimen
Osteopontin	gering	Bindung der Osteoklastenintegrine an die Knochenoberfläche
BMP*	gering	Strukturverwandt mit <i>Transforming Growth Factor-β</i> (TGF- β); Stimulation von Knorpel- und Knochenentwicklung
Sialoprotein	2 %	Bindung von Osteoklastenintegrinen an der Knochenoberfläche
Proteoglykane	gering	Bindung von TGF- β

* BMP = Bone Morphogenic Protein

Anorganische Bestandteile

Als mineralische Komponente des Knochens kommen hauptsächlich unlösliche Calciumphosphate als Hydroxylapatit oder Karbonatapatit vor (KOOLMANN und RÖHM 1998). Ihre Einlagerung in die organische Matrix wird als Mineralisation bezeichnet. HA, der wichtigste Vertreter, hat die Strukturformel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ und ein Calcium/Phosphorverhältnis von 1,67. Innerhalb der Kristallstruktur können statt der OH-Gruppe auch Chlor oder Fluor vorkommen, auch das Calcium kann teilweise durch Eisen, Magnesium, Strontium oder Barium ersetzt sein (NEUMÜLLER 1979).

2.1.1.3 Formen von Knochengewebe

Histomorphologisch lassen sich mikroskopisch zwei Formen von Knochengewebe unterscheiden (MARCOVE und ARLEN 1992, NICKEL et al. 1992):

Zellreicher **Geflecht- oder Faserknochen** mit unregelmäßig angeordneten Knochenbälkchen tritt als Entwicklungsstadium innerhalb des Wachstums und bei physiologischen und pathologischen Knochenneubildungsprozessen auf.

Bei der reifen Form, dem **Lamellenknochen**, lagert sich mineralisierte Matrix lamellenartig um längsgerichtete Hohlräume, die Havers-Kanäle. Die Kanäle haben nutritive Funktion und führen Blutgefäße und Nerven. Sie sind durch kleinere querverlaufende Knochenkanäle (Volkmann-Kanäle) miteinander verbunden. In Hohlräumen innerhalb der konzentrisch angeordneten Lamellen liegen Osteozyten, die über Fortsätze miteinander in Verbindung stehen. Osteozyten, Lamellen und Zentralkanäle bilden zusammen eine funktionelle Einheit, das Osteon. Zwischen Osteonen liegen irreguläre Schaltlamellen.

2.1.2 Mineralisation von Knochengewebe

Osteoid existiert, weil eine bestimmte Zeitspanne zwischen der Sekretion der Matrix und deren Mineralisierung vergeht. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob es sich bei der Knochenmineralisierung um einen aktiven oder passiven Vorgang handelt. Diskutiert werden einerseits ein aktiver, durch Matrixvesikel initiiert Prozess und andererseits eine passive Präzipitation von Calciumphosphaten an geeigneten Keimbildungsplätzen (z.B. auf einer Kollagenfaser), die über die Abwesenheit spezifischer Inhibitoren reguliert wird (BARTL und FRISCH 1993, EPPLE und DOROZHUKIN 2002, AMLING 2003, MATSUSHIRO und MYIASHITA 2004).

BOSKEY (1981) hat in einer Zusammenfassung der Erkenntnisse über Mineralisationsmechanismen auf die besondere Bedeutung der Zellpopulationen hingewiesen. Diese regulieren die Ionenkonzentration in der extrazellulären Matrix und die Sekretion von Makromolekülen, deren spezifische Eigenschaften die Fähigkeit der Knochenmatrix zur Kalzifikation determinieren. Die Mitochondrien der Zellen speichern Calcium und Phosphat und setzen diese Ionen im Verlauf der Mineralisation frei (JEROSCH et al. 2002).

Aus der Synthese von zugfesten Kollagenfasern und darin eingelagerten mineralischen Komponenten in Verbindung mit der spezifischen lamellären Anordnung der morphologischen Strukturen entstehen Materialeigenschaften, die dem Knochengewebe Druck- und Zugfestigkeit, aber auch Elastizität verleihen (NICKEL et al. 1992).

2.1.3 Reaktionen des Knochens auf Defekte

Das Auftreten von Knochendefekten im Organismus setzt eine Kaskade komplexer Reparationsmechanismen in Gang. Bis zur Einführung der stabilen Osteosynthese war nur eine Form, die Knochenheilung unter Kallusbildung, bekannt (BÖNI 2000). Heute wird diese Form als **sekundäre Knochenheilung** oder besser als **spontane Knochenheilung** bezeichnet (STÜRMER 1996). Sie resultiert aus einer gewissen Beweglichkeit zwischen den Fragmenten und ist durch die vom parossalen Gewebe initiierte Kallusbildung gekennzeichnet. Als Kallus wird dabei die Gesamtheit der Gewebsreaktionen, biochemischen und biomechanischen Prozesse bis zur endgültigen knöchernen Fixierung der Fragmente bezeichnet (KATTHAGEN 1986).

Unter der Voraussetzung mechanischer Stabilität im Defektbereich tritt die **primäre** oder **direkte Knochenheilung** auf (STÜRMER 1996). SCHENK und WILLENEGGER (1977) unterschieden histomorphologisch unter diesen Bedingungen eine Kontakt- und eine Spaltheilung:

Das Heilungsmuster ist abhängig von der Größe des Defekts. Bis zu einem Grenzwert von ca. 200 μm können Knochendefekte direkt konzentrisch mit Lamellenknochen aufgefüllt werden (**Kontaktheilung**). Größere Defekte (200 μm - 1 mm) dagegen werden zunächst durch ein Trabekelgerüst aus Faserknochen aufgefüllt (**Spaltheilung**).

Faserknochen kann wesentlich rascher gebildet werden als Lamellenknochen. Osteoblasten erhalten unter diesem Modus der Knochenneubildung die Fähigkeit, Matrix auch aus den Zellseitenflächen auszuschleusen. So kann innerhalb von kurzer Zeit ein Defekt großflächig durch ein Netzwerk von Knochentrabekeln überbrückt werden. Die Maschen des Netzes werden sekundär konzentrisch durch Lamellenknochen aufgefüllt (SCHENK und WILLENEGGER 1977, SCHENK 1978).

Spaltheilung, aber auch die Kallusbildung stellen eine echte Knochenneubildung dar, durch die der Organismus in die Lage versetzt wird, Zusammenhangstrennungen in kurzer Zeit auszugleichen.

Zeitlich nacheinander laufen bei der Heilung von Defekten drei Hauptphasen ab (FROST 1989, BARTL und FRISCH 1993, SØBALLE 1993):

1. Die Initial- oder Entzündungsphase (wenige Tage)

Im Defektbereich bildet sich ein Hämatom aus, das durch Formation eines Granulationsgewebes, das den Spaltraum überbrückt, organisiert wird. Über lokale Mediatoren und einwandernde Entzündungszellen werden Vorläuferzellen zur Differenzierung und Organisation neuer Gefäße und Fibroblasten angeregt.

2. Die Reparationsphase (bis 2 Wochen)

Innerhalb des Granulationsgewebes werden Osteoblasten und/oder Chondroblasten organisiert, die mit der Produktion extrazellulärer organischer Matrix (Osteoid/Chondroid)

beginnen. Histogenetisch kann Knochengewebe auf Grundlage bindegewebiger (desmale Ossifikation) oder knorpeliger Vorstufen (enchondrale Ossifikation) entstehen. Beide Formen können bei der Defektheilung isoliert oder nebeneinander vorkommen. Dabei entsteht zunächst ein Trabekelgerüst aus Faser- oder Geflechtknochen, das den Defektbereich überbrückt.

3. Die Stabilisierungsphase oder *Remodeling Phase* (4 Wochen bis 6 - 8 Monate)

Mit dem als Knochenreifeung bezeichneten Vorgang wird der Faserknochen durch differenzierten Lamellenknochen ersetzt.

Für die Knochenneubildung ist eine vom Lager ausgehende Revaskularisierung der Defektzone essentiell. SHAPIRO (1988) beschreibt, dass vom Knochenmark ausgehend Gefäße im rechten Winkel zur Längsachse des Knochens einwachsen; in deren Orientierung wird Faserknochen angebildet. Auch nach 12 Wochen stehen Reparationslamellen und Osteone des Wirtsknochens senkrecht aufeinander, was bei der histologischen Beurteilung Beachtung findet. Erst nachdem Wirtsknochen und neu gebildete Knochensubstanz histologisch nicht mehr unterscheidbar sind, kann die Einheilung von Implantaten als abgeschlossen angesehen werden.

Gelingt es nicht, das Defektgebiet zu stabilisieren, wird ein intermediäres Stützgewebe entwickelt, dessen Fasern in die angrenzenden Knochenflächen eingemauert werden; neben Bindegewebe kommt unter instabilen Bedingungen auch Faserknorpel vor (SCHENK und WILLENEGGER 1977, STÜRMER 1996).

Über eine Vielzahl von Faktoren werden die beteiligten Zellpopulationen und damit Knochenneubildung und das *Remodeling* des heilenden Knochens beeinflusst: Vitamine und Hormone (u. a. Kalzitinin, Parathormon, Leptin, AMLING 2003) sowie Wachstumsfaktoren (u.a. *Platlet Derived Growth Factor*, *Insulin like Growth Factor-I*, *Transforming Growth Factor- β* , *Bone Morphogenic Protein*, JEROSCH et al. 2002) wirken neben chemisch-physikalischen (Sauerstoffpartialdruck, hydrostatischer Druck, CARTER et al. 1998, SIMMONS et al. 2001), elektrischen (z.B. Piezoelektrizität, ANON. 2002) und mechanischen Bedingungen (GOODMAN 1994, BURR et al. 2002, CHAO und INOUE 2003) modulierend auf Zellproliferation, Differenzierung und Matrixsynthese.

2.1.4 *Remodeling*

Seit den Arbeiten von WOLFF (1892) ist bekannt, dass Knochengewebe die Fähigkeit besitzt, seine Architektur an die funktionelle Belastung der Umgebung anzupassen. Die Analyse von Gewebeformationen in Abhängigkeit von biomechanischen Einflüssen zeigt, dass vor allem Druckkräfte zum Knochenanbau, Entlastung zur Knochenatrophie, Zugkräfte zur Bindegewebsbildung und Scherkräfte zur Knorpelbildung führen (GOODMANN 1994, CARTER 1998 CHAO und INOUE 2003).

Remodeling bezeichnet einen lebenslang anhaltenden dynamischen Prozess des Knochenumbaus. Er beinhaltet die selektive Resorption vorhandenen Knochens durch Osteoklasten, gefolgt von Knochenneubildung durch Osteoblasten (FROST 1980). Unter physiologischen Bedingungen führt das zu einem dynamischen Gleichgewicht mit Erhalt der strukturellen Integrität des Knochengewebes. Lokal fungieren Osteozyten als die Mechanosensoren des Knochens, die über einen negativen Rückkopplungsmechanismus (Ausbleiben eines inhibitorischen Signals) die Aktivität von Vorläuferzellen, Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteoklasten und damit den gesamten Prozess steuern (KAISER und DELLING 2002). Daneben existiert auch eine zentrale Steuerung des *Knochenremodelings* über spezifische Rezeptoren der Osteozyten (AMLING et al. 2000).

Auch auf die Transformation von Geflechtknochen in organisierten Lamellenknochen nach reparativer Knochenneubildung um Implantate wird der Begriff *Remodeling* angewendet (DE CARVALHO LOPES und KÖNIG JUNIOR 2002), so dass die oben genannten Grundsätze auch für die Implantation von Knochenersatzmaterialien gelten (D'ANTONIO et al. 1996).

2.2. *Knochenersatzstoffe*

Knochenersatzstoffe sind den Biomaterialien zugeordnet. Dieser Begriff umfasst eine Vielzahl von Werkstoffen, die in den Organismus implantiert werden, um biologische Strukturelemente zeitlich begrenzt oder dauerhaft in deren (Teil-) Funktionen zu ersetzen. Mit dem Einsatz von Biomaterialien für den Knochenersatz soll die Knochenheilung unter anderem hinsichtlich folgender Parameter beeinflusst werden (RUEGER 1998):

1. Menge des neu gebildeten Knochens
2. Qualität des neu gebildeten Knochens
3. Geschwindigkeit der Einheilung des Implantats
4. Mechanische Belastbarkeit im Vergleich zum autogenen knöchernen Transplantat.

Von Materialien, die für den totalen Ersatz erkrankter Gelenke Verwendung finden sollen, müssen sowohl hohe mechanische Belastbarkeit als auch hervorragende biologische Eigenschaften gefordert werden. **Biokompatibilität**, das heißt absolute Gewebeverträglichkeit und das Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen, stellt die Grundvoraussetzung dar, die an ein Implantatmaterial zu stellen ist, um eine Gewebeintegration überhaupt zu erreichen (SCHNÜRER 2003).

2.2.1 Einteilung der Biomaterialien und Definitionen

Innerhalb der grundsätzlich biokompatiblen Werkstoffgruppen, die für den Knochenersatz Verwendung finden, existieren Unterschiede in der Wertigkeit der biologischen Wechselwirkung mit dem Wirtsgewebe. OSBORN (1979) schlug eine Einteilung synthetischer Knochenersatzmaterialien nach ihren biologischen Eigenschaften vor (Tab. 2). Nach ihrer chemischen Zusammensetzung gehören die Materialien zu Keramiken, Metallen, Polymeren und Kompositen.

Tab. 2: Einteilung von Biomaterialien hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften nach OSBORN (1979)

Biologische Eigenschaft	Implantatmaterial	Reaktion des Wirtsknochens	Implantat Interface
1. biotolerant	Knochenzement, rostfreie Stähle, Chrom-Kobalt Legierungen	Distanzosteogenese	Bindegewebsschicht zwischen Implantat und Knochen
2. bioinert	Aluminiumoxid, Zirkonoxid, Kohlenstoffwerkstoffe, Titan, Titanlegierungen	Kontaktosteogenese	direkter Kontakt zwischen Implantat und Knochen
3. bioaktiv	Calciumphosphathaltige Keramiken (u.a. Hydroxylapatit), Glaskeramiken	Verbundosteogenese	chemisch-biologische Verbindung zwischen Implantat und Knochen

Nach SCHENK (1986) bezeichnet **Bioaktivität** die Fähigkeit eines Materials zur positiven Interaktion mit der Gewebedifferenzierung, deren Ergebnis eine Bindung und Adhäsion von Knochen entlang der Grenzfläche zwischen Implantat und Empfängergerewebe ist. Die Einwirkung eines bioaktiven Implantats wird dabei in **Osteokonduktion** und **Osteoinduktion** unterschieden.

Osteokonduktion: Durch chemische und/oder physikalische Faktoren wird ein gerichtetes Wachstum von Osteonen angeregt.

Osteoinduktion: Ein Implantat hat die Fähigkeit, Knochenneubildung in heterotopem Gewebe (Weichgewebe) zu induzieren.

2.2.2 Eigenschaften von Keramiken für den Knochenersatz

Als Biomaterialien werden drei Arten von Keramik eingesetzt: 1) **Oxidkeramiken**, 2) **calciumphosphathaltige Glaskeramiken** und **Gläser** und 3) **Calciumphosphatkeramiken**.

Oxidkeramiken

Keramiken aus Aluminiumoxid und Zirkonoxid stellen bioinerte Materialien mit guten tribologischen Eigenschaften dar; beide finden deshalb in der Hüftendoprothetik als Gleitpartner Anwendung (WILLMANN 1997, WINTERMANTEL und HA 1998, PICONI und MACCAURO 1999, WILKE et al. 2002). Unter dem Begriff *Tribologie* wird die Gesamtheit der Wechselwirkungen zwischen sich gegeneinander bewegendenden Grenzflächen von Festkörpern zusammengefasst (WINTERMANTEL und HA 1998).

Glaskeramiken

Basierend auf einer Siliziumstruktur (SiO_2) besteht das Prinzip der **Glaskeramik** darin, dass lösliche Calciumphosphationen in die Bioglasstruktur inkorporiert sind. Nach deren Implantation bildet sich eine Schicht biologischen Apatits auf der Bioglasoberfläche, die eine direkte Verbindung zwischen Knochengewebe und Implantatmaterial ermöglicht. (HENCH und PASCHA 1973, FURUSAWA et al. 1998, WHEELER et al. 2000)

Calciumphosphatkeramiken

Die Gruppe der Calciumphosphate umfasst eine Vielzahl von Verbindungen. Parameter zu deren Unterscheidung sind das molare Calcium-Phosphor-Verhältnis, die Löslichkeit in Wasser und die kristalline Mikrostruktur. Allgemein gilt: je kleiner das Ca:P Verhältnis und je niedriger die Kristallinität, desto besser wasserlöslich ist das Calciumphosphat (OSBORN und NEWSELY 1980, EPPLE und DOROZHKIN 2002). Eine Übersicht dazu findet sich bei EPPLE und DOROZHKIN (2002) sowie bei WILKE et al. (2002). Sie kommen natürlich vor oder können synthetisch hergestellt werden.

Calciumphosphate werden von vielen Organismen zu unterschiedlichen Zwecken aufgebaut und treten auch als pathologische Verkalkungen in Erscheinung (BOSKEY 1981, MATSUSHIRO und MIYASHITA 2004). Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ und Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mit einem Ca:P Verhältnis von 1,67 bzw. 1,5, als die Basissubstanzen, sind glasartig-amorphe oder kristalline Verbindungen, die hinsichtlich ihrer elementaren chemischen Zusammensetzung der Mineralsubstanz dem biologischen Apatit des Knochens sehr ähnlich sind (SCHNÜRER et al. 2003). Unter diesem Gesichtspunkt geht man davon aus, dass Hydroxylapatit als physiologisches Mineral in den Knochen eingebaut wird (HEISE et al. 1990). Diese Materialien auf der Basis einer Calciumorthophosphatstruktur finden in Form von Keramiken Anwendung als Knochenersatzstoffe. Die Eigenschaften der Endprodukte können im Rahmen keramischer Herstellungs- und Verarbeitungs-

verfahren durch die Auswahl geeigneter Rohstoffe und Prozessparameter in ihren Eigenschaften modifiziert und an die Bedürfnisse von Implantaten angepasst werden (OSBORN 1987, WINTERMANTEL et al. 1999, SCHNÜRER et al. 2003).

JARCHO (1981) macht darauf aufmerksam, dass ein Fehlen von Standards, insbesondere bei der Herstellung der Ausgangsmaterialien, zu einer Vielzahl von Biomaterialien mit verschiedenen (oftmals nicht reproduzierbaren) kristallinen und chemischen Eigenschaften führte. Um Vergleiche zwischen *in vivo* Ergebnissen anstellen zu können, wurde deshalb eine eingehende Charakterisierung der Materialeigenschaften gefordert (KOSTER et al. 1976). Heute gibt es für Hydroxylapatit in der medizinischen Anwendung (*medical-grade HA*) hinsichtlich der technisch physikalischen Eigenschaften eine ASTM- (*American Society for Testing and Materials*) und eine ISO Norm (WILLMANN 1990, WILLMANN 1999). Eine Normbestimmung innerhalb des Anwendungsgebietes der Beschichtungen ist dagegen noch nicht abgeschlossen. Auch existieren bisher keine standardisierten Biokompatibilitätskriterien für Keramiken (WILKE et al. 2002).

Hinsichtlich physikalischer Eigenschaften zeichnen sich Calciumphosphate durch höhere Kristallinität im Vergleich zum Knochen, hohe Sprödigkeit sowie geringe Zug- und Druckfestigkeit aus (JARCHO 1981, TADIC und EPPL 2004). Als Knochenersatzmaterialien kommen sie in Form von Festkörpern, als Granulate oder als Beschichtungen auf metallischen Substraten zur Anwendung. Granulate können lediglich als Füller bei ansonsten erhaltener mechanischer Stabilität des Knochenabschnitts eingesetzt werden (OSBORN 1987, STÜTZLE et al. 1998). Keramiken als porös gestaltete oder kompakte Formkörper erreichen zwar größere mechanische Stabilität, werden aber meist nur randständig in den Knochen integriert (JENSEN et al. 1996, CORNELL 1999). Solche dauerhaft im Knochen verbleibenden Fremdmaterialien beeinträchtigen unter Umständen die Belastbarkeit des Gewebes.

2.2.3 Calciumphosphatkeramiken und ihre Anwendung als Beschichtungsmaterial

Die mechanischen Eigenschaften der Calciumphosphatkeramiken machen sie für belastete Implantate ungeeignet. Deshalb soll durch die Beschichtung von Metallen mit bioaktiven Keramiken eine Aufgabenteilung erreicht werden, um für lasttragenden Knochenersatz sowohl den chemisch-biologischen als auch den mechanischen Anforderungen gerecht zu werden (DUCHEYNE und CUCKLER 1992). Hydroxylapatit ist das am meisten verwendete und bestuntersuchte Beschichtungsmaterial.

2.2.3.1 Beschichtungsverfahren und Eigenschaften thermisch gespritzter Keramikbeschichtungen

Ein etabliertes Beschichtungsverfahren für bioaktive Hydroxylapatitbeschichtungen stellt das atmosphärische Plasmaspritzen dar. Keramikpartikel werden in einer über 10000°C heißen Plasmaflamme aufgeschmolzen und in Richtung der zu beschichtenden Metalloberfläche beschleunigt. Die mit hoher Geschwindigkeit auftreffenden Partikel erstarren, verklammern sich durch Schrumpfungsprozesse mit der Oberfläche und bilden lagenweise eine Schicht mit Mikro- und Makroporen (GRUNER 2004).

Die prozessbedingt hohen Temperaturen führen partiell zu einem thermischen Zerfall des Ausgangsmaterials. Infolge des inkongruenten Schmelzverhaltens von Hydroxylapatit entsteht eine Mischphase unterschiedlicher Calciumphosphate, die neben dem ursprünglichen HA auch amorphe Phasen, β -Tricalciumphosphat, Tetracalciumphosphat und CaO enthält (HARTMANN et al. 2000, CHANG et al. 2001, HEIMANN 2004). Deshalb kann streng genommen nicht mehr von einer Hydroxylapatit(-keramik)schicht gesprochen werden (HEIMANN 2004). In der Literatur wird dieser Bezeichnung der Einfachheit halber der Vorzug gegeben. Sie soll auch hier beibehalten werden. Spezifische Eigenschaften thermisch gespritzter Schichten werden somit von den Ausgangsmaterialien und durch Variation von Prozessparametern determiniert (ANON. 2004).

Für das *in vivo* Verhalten solcher Schichten sind deren chemische Zusammensetzung, Schichtdicke, Kristallinität, Phasenreinheit, Haftfestigkeit und Abbaubarkeit im biologischen Milieu von Bedeutung (HEIMANN et al. 1997). WINTERMANTEL und HA (1998) benennen Anforderungen an diese Parameter, die von Hydroxylapatitbeschichtungen für den klinischen Einsatz erfüllt werden sollten (Tab. 3).

Tab. 3: Anforderungsprofil an die Hydroxylapatitbeschichtung für den klinischen Einsatz. Modifiziert nach WINTERMANTEL und HA (1998)

<i>Eigenschaft</i>	<i>Anforderung</i>	<i>Begründung</i>
Schichtdicke	50 μm	bei Schichtdicken < 50 μm findet Resorption statt
	200 μm	obere Grenze für die Erhaltung genügend hoher Festigkeit
Porengröße	>100 μm	minimale Porosengröße für das Einwachsen von Knochengewebe
HA-Gehalt	> 95 %	minimale Reinheit für die Biokompatibilität
Kristallinität	> 70- 95 %	zunehmende Resorbierbarkeit bei abnehmender Kristallinität
Haftfestigkeit	> 35 MPa	Verhinderung des Abplatzens

Der Verbund zwischen Keramik und Metallsubstrat muss den *in vivo* auftretenden Scher- und Torsionskräften standhalten. Um die Haftfestigkeit der Partikel zu verbessern, wird die Metalloberfläche durch Sandstrahlen aufgeraut (ANON. 2004). Nach GEESINK et al. (1987) und WILLMANN (1999) sollten die Schichtdicken zwischen 50 und 150 µm betragen, um einerseits Homogenität und andererseits eine gute Haftung auf dem Implantat zu gewährleisten. Die Haftfestigkeit zwischen HA und Metall nimmt mit zunehmender Schichtstärke ab. Dichte Beschichtungen unter 50 µm sind aber mit dem atmosphärischen Plasmasprayverfahren technisch nicht realisierbar.

Eine Optimierung des Verfahrens wurde durch das Aufbringen von Schichten unter Vakuumbedingungen in Verbindung mit adhäsiv wirkenden Verbundschichten zwischen Metallsubstrat und Keramik erreicht (HEIMANN et al. 1997, KETTNER 1997, GRUNER 2004, HEIMANN 2004). ZHENG et al. (2000) erzielten über eine Annäherung der Wärmedehnungskoeffizienten durch Plasmaspritzen eines Hydroxylapatit-Titan Komposits eine Stärkung des Verbundes zwischen Substrat und Beschichtung.

Neuere Verfahren erlauben eine Etablierung dünner Calciumphosphat-Schichten auf Implantaten. Beispielsweise wurden von HAYAKAWA et al. (2002) Schichten von 1-2 µm Dicke, die mittels Bedampfung (*Physical Vapor Deposition, PVD*) aufgebracht wurden, erfolgreich tierexperimentell getestet. BARRÈRE et al. (2002, 2003) entwickelten ein Verfahren, dass die Abscheidung biomimetischen Apatits (*Bonelike Carbonated Apatite, BCA*) auf Metallen in *SBF* (*Simulated Body Fluid*) beschleunigt und zu Schichten mit ca. 30 µm Dicke führt. Durch Umwandlung der vorhandenen Oxidschicht auf Implantaten aus Ti6Al4V wurden in einer calciumhaltigen Salzschnmelze Reaktionsschichten von 1-2 µm Dicke aus Calciumtitanat ($\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$) erzeugt (PLOSKA et al. 2004).

2.2.3.2 Das Metallsubstrat

Als metallische Substrate für Keramikbeschichtungen werden im wesentlichen Titan, seine Legierung Ti6Al4V sowie Kobalt-Chrom Legierungen verwendet (JAFFE und SCOTT 1996). Insbesondere hat sich die Titanlegierung (Ti6Al4V) bewährt und breite Anwendung in der Implantologie gefunden. Sie zeichnet sich durch hohe mechanische Festigkeit, niedriges Elastizitätsmodul, Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität aus (WINTERMANTEL und HA 1998). Das E Modul der Titanlegierung (110 GPa) ist nur halb so hoch wie das der Kobalt-Chrom Legierung (220 GPa). Daraus resultiert eine geringere Steifigkeit des Materials, die über eine Annäherung der Elastizitätsmodule von Knochen (20 GPa) und Metall Spannungen an den jeweiligen Grenzflächen verringert und so eine bessere Kraftübertragung ermöglicht (WILLMANN 1999).

Titan und seine Legierungen bilden bei Kontakt mit Sauerstoff eine stabile Oxidschicht auf der Oberfläche, die das Material korrosionsbeständig macht und Grundlage seiner guten biologischen Eigenschaften ist (WINTERMANTEL und HA 1998).

2.3 Resorbierbarkeit/ Löslichkeit und biologische Reaktionen auf Calciumphosphatkeramik-Beschichtungen im Knochengewebe

2.3.1 Resorbierbarkeit/ Löslichkeit

Die Abbaubarkeit der jeweiligen Keramik ist eine Funktion von chemischer Zusammensetzung einerseits und der Materialform andererseits. Lösungsbeständigkeit und Langzeitstabilität in der biologischen Umgebung versprechen Materialien von hoher Kristallinität und großer Dichte, während amorphe Struktur und porös gestaltete Keramiken die *Interfaceaktivität* steigern und damit die biologische Abbaubarkeit von Calciumphosphatkeramiken erhöhen (OSBORN und NEWSELY 1980, JARCHO 1981). Im Zusammenspiel existieren zwei Möglichkeiten der Degradation von Beschichtungen: chemische Löslichkeit innerhalb der biologischen Kompartimente und zellvermittelte Prozesse (Phagozytose, Abbau durch Osteoklasten) (JARCHO 1981, SCHILLING et al. 2004). Physikochemisch sind reine Hydroxylapatitkeramiken im biologischen Milieu unlöslich (RUEGER et al. 1998). Tricalciumphosphate (TCP) weisen dazu im Vergleich eine allgemein höhere Löslichkeit und Resorbierbarkeit auf (RUEGER et al. 1998, LIND et al. 1999).

Die Langzeitstabilität von HA Beschichtungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Autoren berichten über Resorption von HA, andere wiederum verneinen seine biologische Abbaubarkeit. Da bei den jeweiligen Autoren oftmals konkrete Charakterisierungen der verwendeten Beschichtungen und Prozessparameter fehlen, ist eine Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse nur bedingt gegeben bzw. kann nicht in jedem Fall als Materialeigenschaft von „HA“ verallgemeinert werden (siehe 2.2.2 *Eigenschaften von Keramiken für den Knochenersatz*).

Prozessbedingt entstehen beim Plasmaspritzen von Hydroxylapatit Anteile von amorphen Phasen, TCP und CaO. Die Zersetzungsprodukte haben eine wesentlich höhere Löslichkeit in Wasser bzw. im biologischen Milieu, was zu einer verringerten Resorptionsresistenz der Beschichtung im Vergleich zum ursprünglichen Hydroxylapatit führt (HEIMANN et al. 1998). Selektives Herauslösen von Bestandteilen aus unteren Schichtbereichen führt zu Änderungen der Schichtmorphologie und Abnahme der Schichtdicke während der Implantation und kann Schichtdelaminationen verursachen (HEIMANN et al. 1998, MAC DONALD et al. 2001, HEIMANN 2004).

COATHUP et al. (2000) fanden bei post mortem untersuchten Hüftendoprothesen keine Reduktion der HA Beschichtung. Auch COOK et al. (1988b) sowie LIND et al. (1999) fanden in transkortikalen Modellen beim Hund keine Abnahme der Schichtdicken in Zeiträumen bis zu 32 Wochen post implantationem. CLEMENS et al. (1998) fanden in Zeiträumen von 24 Wochen annähernd vollständige Resorption von HA Beschichtungen mit einer Kristallinität von 25-30 %. Im Vergleich dazu zeigten Schichten mit höherer Kristallinität (60-63 %) nur geringe Anzeichen von Resorption. Es wurden keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Schichtabbaus und der Art des darüber liegenden Gewebes gefunden. Fluorapatit als Beschichtungsmaterial mit einer

Kristallinität von 85-90 % zeichnet sich im Vergleich zu HA durch eine höhere chemische Stabilität im knöchernen Lager aus (CLEMENS et al. 1998).

Auch biochemische und biologische Faktoren beeinflussen die Resorption von HA Beschichtungen. RUEGER et al. (1998) sowie DARIMONT et al. (2002) nennen als Voraussetzung für den zellvermittelten Abbau einer Keramikoberfläche deren Exposition in ein *freies Milieu*, das heißt unbedeckt von vitalem Knochen. Die Auflösung von HA ist bei erniedrigtem pH-Wert, Bedingungen wie sie im Entzündungsgebiet herrschen, erleichtert (WILLMANN 1999). REICHEL et al. (1995) berichten über massiven Abbau der HA Beschichtung innerhalb von acht Wochen bei einer Patientin mit rheumatoider Arthritis.

Inwieweit ein vollständiges Verschwinden der Beschichtung die Langzeitstabilität lasttragender Implantate in Frage stellen kann, ist noch nicht vollständig geklärt. Nach Meinung von SØBALLE (1993) muss eine vollständige Resorption nicht zwangsläufig zu einer Implantatlockerung führen, wenn mit entsprechender Oberflächengestaltung und Materialwahl dem Knochen die Möglichkeit zur festen Verbindung mit der Metalloberfläche gegeben wird. Das wird von REICHEL et al. (1995), TONINO et al. (1999), LINTNER et al. (2001) und TONINO et al. (2001) gestützt.

TONINO et al. (1999) untersuchten klinisch erfolgreiche Elemente beschichteter Hüftendoprothesen. Nach deren Beobachtungen scheint der zellvermittelte Abbau der Hauptgrund für den Verlust der HA Beschichtung zu sein. Die Ausdehnung der Kontaktfläche Knochen-Implantat war dabei unabhängig von der Menge Keramik, die nach dem Abbau der HA-Beschichtung auf der jeweiligen Implantatoberfläche verblieb. Nach LINTNER et al. (2001) führte die Resorption der HA Beschichtung auf *AHS-Hüftendoprothesen* (Firma Logimed, Österreich) zu einer sekundären Stabilisierungsphase durch knöcherne Neubesiedlung der Metalloberfläche, wobei die Knochenneubesiedlung auf die Oberflächenrauigkeit der Titanlegierung zurückzuführen war.

2.3.2 Einheilung beschichteter Implantate in den Knochen

Der Defektbereich zwischen Knochen und Implantat, das *Interface*, wird bei ordnungsgemäßem Ablauf der reparativen Prozesse analog der Spaltheilung stabiler Osteosynthesen organisiert. Als Alternativen der Integration des Implantats mit Anwachsen von ortstypischem Gewebe gelten die bindegewebige Einkapselung von Materialien im Sinne einer Isolation des Implantats gegen die Umgebung, die Entzündungsreaktion als Beginn einer Abstoßung oder die Tumorbildung (WINTERMANTEL et al. 1998).

Calciumphosphatkeramiken, insbesondere HA Keramiken, sind als bioaktive Werkstoffe in der Lage, die Apposition von Knochengewebe aktiv zu stimulieren (JARCHO 1981, BRILL und KATTHAGEN 1987, LEE et al. 2001). Grundlage dieser Eigenschaft soll eine mikroskopisch dünne Schicht biologischen Apatits sein, die sich auf der Keramikoberfläche im knöchernen Lager durch Lösungs- und Präzipitationsprozesse formiert (JARCHO 1981, DUCHEYNE und QIU 1999). Wenn die Bioaktivität dem propagierten Lösungs- und Fällungsmechanismus folgt, dann führt eine erhöhte

Löslichkeit bis zu einem gewissen Grad zu einer erhöhten Knochenneubildungsrate (PORTER et al. 2003).

DARIMONT et al. (2002) weisen darauf hin, dass die exakte Wirkungsweise der Keramiken bei der Knochenheilung noch nicht vollständig verstanden ist und machen dahingehend folgende Vorschläge:

- erhöhte Adsorption und Produktion von Proteinen (Wachstumsfaktoren)
- erleichterte Adhäsion von Osteoblasten an eine bekannte Oberfläche (HA ist der mineralische Anteil des Knochens)
- fördernder Einfluss auf die zentrifugale Osteogenese
- gesteigertes Kristallwachstum und Matrixmineralisation.

Das Osteointegrationsvermögen von Hydroxylapatitbeschichtungen auf Metallsubstraten wurde in zahlreichen *in vivo* Studien an unterschiedlichen Modellen, innerhalb verschiedener Zeitfenster und hinsichtlich verschiedener Parameter evaluiert. Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über Ergebnisse zu denen ein breiter Konsens in der Literatur herrscht.

Knochengewebe geht mit Hydroxylapatitbeschichtungen einen direkten bindegewebsfreien Verbund ein (GEESINK et al. 1987, THOMAS und COOK 1987, COOK et al. 1988b, GEESINK et al. 1988, WEINLAENDER et al. 1992, BURR et al. 1993, MORONI et al. 1994, MORONI et al. 1998, LEE et al. 2001, JINNO et al. 2002). Osteoblasten lagern sich der Oberfläche beschichteter Implantate auf und deponieren Osteoid auf der Keramik. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der Begriff der chemisch-biologischen Verbindung, auch Verbundosteogenese, geprägt (GEESINK et al. 1987, GEESINK et al. 1988).

COOK et al. (1988b) sowie SØBALLE (1993) beschreiben, dass Knochenwachstum von zwei Oberflächen ausgehend, von der HA Oberfläche und vom umliegenden Knochen, stattfinden kann. DONATH et al. (1985), die Hydroxylapatitimplantationen im engen zeitlichen Fenster von 4,5,6,7,14 Tagen histologisch beobachteten, können diese Möglichkeit bidirektionaler Knochenneubildung nicht bestätigen. Die Autoren konnten aber zeigen, dass primär stabile HA-Keramikzylinder bereits nach 14 Tagen in größeren Abschnitten oberflächlich von Geflechtknochen überkleidet sind. Hydroxylapatit ermöglicht Matrixmineralisation direkt auf seiner Oberfläche (THOMAS und COOK 1987, COOK et al. 1988b).

Im Vergleich zu unbeschichteten Titan- bzw. Ti6Al4V Implantaten wird bei beschichteten Implantaten innerhalb der Initial- und Reparationsphase mehr Knochengewebe angebildet und die Kontaktfläche zum Implantat erhöht (GOTTLANDER et al. 1992, WEINLAENDER et al. 1992, BURR et al. 1993, GOTTLANDER et al. 1997, VIDIGAL et al. 1999, COATHUP et al. 2000, JINNO 2002, ONG et al. 2004,). Die Hydroxylapatitbeschichtung beschleunigt sowohl die Knochenneubildung, als auch die Knochenreifung (BURR et al. 1993, VIDIGAL et al. 1999).

MORONI et al. (1994) beschreiben als morphologisches Korrelat für die osteophilen Eigenschaften von HA Beschichtungen die Ausbildung pilzförmiger Knochentrabekel im *Interface*, denen bogenförmige bei unbeschichteten Implantaten gegenüber stehen. Die Form der Trabekel, die unter dem Einfluss von HA ausgebildet wird, erlaubt einen breitbasigen Kontakt zur Implantatoberfläche (BRILL und KATTHAGEN 1987, ZECHNER et al. 2003), während bogenförmige Formationen als Mangel direkter Apposition von Knochensubstanz gesehen werden (MORONI et al. 1994). Ebenso führt eine Beschichtung von Implantaten zu einer gleichmäßigeren Verteilung von Knochenkontakt (COATHUP et al. 2000).

Thermisch gespritzte Calciumphosphatkeramik-Beschichtungen metallischer Implantate bieten aufgrund der oben genannten Eigenschaften das Potential, die Osteointegration zu beschleunigen. Damit kann die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Verbindungsstärke zwischen Knochen und Implantat verkürzt werden (GEESINK et al. 1987, THOMAS und COOK 1987), was im Falle ihrer Anwendung bei Endoprothesen eine frühere Sekundärstabilität und Belastbarkeit ermöglicht.

2.3.3 Die Oberflächengestaltung von Implantaten im biologischen Kontext

Neben chemisch-biologischen Eigenschaften, die den Calciumphosphatkeramiken als spezifische Materialcharakteristik zuzuordnen sind, ist eine geeignete Oberflächengestaltung für die knöcherne Integration von Implantaten essentiell (THOMAS und COOK 1985). Eine umfangreiche Literaturübersicht dazu findet sich bei SYKARAS et al. (2000). In der Literatur werden demnach glatte (*smooth*) Oberflächen mit einer Rauigkeit von $R_a < 1 \mu\text{m}$ und raue (*rough*) mit $R_a > 1 \mu\text{m}$ unterschieden. Typische Rauigkeiten von Plasmaspray-Beschichtungen bewegen sich im Bereich $R_a = 1,59 - 2,94 \mu\text{m}$. Auch Titanoberflächen, die beispielsweise mit Aluminiumoxid sandgestrahlt werden, erhalten je nach Korngröße definierte Rauigkeiten. Poröse Oberflächen werden u. a. durch Porengröße und Porenvolumen (Porosität in %) charakterisiert. Keramische Spritzschichten zeichnen sich durch eine definierte Porosität und Rauigkeit aus, diese Parameter nehmen zusätzlich Einfluss auf *in vivo* Reaktionen.

Unmittelbar nach der Implantation findet eine Benetzung des Materials mit Plasmabestandteilen statt; einige Moleküle gehen, beeinflusst durch die Gestaltung der Oberfläche, eine innige Verbindung mit dem Implantat ein (KIESWETTER et al. 1996, WINTERMANTEL et al. 1999). Unter anderem ist Fibronectin in der Lage, an verschiedene Oberflächen zu binden und über funktionelle Gruppen die Anheftung mesenchymaler Zellen zu modulieren (PEARSON et al. 1988). Die Aktivität der Zellen wird dabei maßgeblich durch die Oberflächenrauigkeit bestimmt. Untersuchungen von Osteoblasten, die auf porösen oder rauen Titanoberflächen kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen auf glatten Oberflächen eine Steigerung der Produktion von extrazellulärer Matrix (GRÖSSNER-SCHREIBER und TUAN 1991) sowie von lokalen Wachstumsfaktoren wie Prostaglandin E2 und *Transforming Growth Factor β 1* (KIESWETTER et al. 1996). Vier und acht

Tage nach Implantation fanden SIMMONS et al. (1999) weitreichende Gewebeintegration und nach 16 Tagen beschleunigte Matrixmineralisation bei Titanimplantaten mit porös gestalteter Oberfläche. Auch MÜELLER et al. (2003) machen durch Messungen des Metall-Knochen-Kontaktes an sandgestrahlten Titanimplantaten mit unterschiedlicher Rauigkeit deutlich, dass innerhalb der Reparationsphase (28 Tage) die geometrische Gestaltung der Implantatoberfläche bei der Initialisierung des Osteointegrationsprozesses eine wichtige Rolle spielt. BOBYN et al. (1980) erreichten mit Porengrößen zwischen 50 und 400 µm die beste Fixation von Implantaten im Knochen.

HACKING et al. (2002) vertreten die Ansicht, dass der spezifischen Oberflächentopographie wie sie durch den Plasmaspritzprozess geschaffen wird, nicht der Oberflächenchemie von HA Beschichtungen die dominante Rolle innerhalb des Osteointegrationsprozesses zukommt.

2.3.4 Nachteile von Hydroxylapatitbeschichtungen

HA Beschichtungen werden wegen der bislang ungenügend aufgeklärten biologischen und mechanischen Langzeitstabilität (siehe 2.3.1 *Resorbierbarkeit/ Löslichkeit*), trotz experimentell belegbarer Vorzüge, in ihrem klinischen Wert kritisch diskutiert. Nach BLOEBAUM und DU PONT (1993) sowie BLOEBAUM et al. (1994), die Elemente explantierter Hüftendoprothesen untersuchten, kann die Freisetzung von HA Partikeln aus dem Keramik-Substrat-Verbund zu Fremdkörperreaktionen und Osteolysen und mithin zum Versagen der Prothese führen. Des Weiteren erwiesen sich HA beschichtete Implantate gegenüber reinen Titanimplantaten als anfälliger für die Entwicklung schwerwiegender Entzündungen bei bakterieller Kontamination (OOSTERBOS et al. 2002).

2.4 Das Tiermodell

Die Tatsache, dass *in vitro* Methoden auf molekularer und zellulärer Ebene den Organismus als hochkomplexes System nicht in seiner Gesamtheit ersetzen können, begründet die Akzeptanz tierexperimenteller Studien zur Untersuchung spezifischer medizinischer Fragestellungen bei fehlender Verfügbarkeit alternativer Modelle (HIGGINS 2001). Mit der Nutzung lebender Individuen für experimentelle Zwecke sind an das Versuchsmodell, insbesondere hinsichtlich der speziesübergreifenden Übertragbarkeit bzw. Verallgemeinerungsfähigkeit der Ergebnisse, besondere Ansprüche zu stellen.

Bezogen auf die Knochenregeneration waren nach KATTHAGEN (1986) tierexperimentelle Untersuchungen in der Lage, die vielschichtigen Probleme von Knochentransplantaten zu erfassen. Das gilt in gleicher Weise für Knochenersatzmaterialien. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die am Kaninchen gewonnen wurden, auf größere Spezies bzw. den Menschen ist nur bedingt möglich. So geht man davon aus, dass das Knochengewebe kleinerer Tiere durch deren höhere metabolische Aktivität auf Stimuli aktiver und beschleunigt reagiert; außerdem ist das Kaninchen aufgrund seiner

geringen Körpergröße für Fragestellungen bei denen Belastungsbedingungen eine Rolle spielen ungeeignet (WISSING et al. 1990, BUMA et al. 2004). Das Kaninchenmodell ermöglicht jedoch mit der histologischen Untersuchung zellulärer Reaktionen des Knochens eine Evaluierung der biologischen Reaktion auf verschiedene Implantate, wenn sie sich auf eine vergleichende Beurteilung der einzelnen Materialien untereinander beschränkt (GÜNTHER et al. 1998, KATTHAGEN 1986, WISSING et al. 1990, LIEBSCHNER 2004). Auch histomorphometrisch lassen sich nach BURR (1993) zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Knochenneubildung erzielen.

Als Implantationsort haben sich die distalen Femurkondylen bewährt, da man an dieser Stelle ausreichend Knochensubstanz vorfindet und der operative Zugang mit einer geringen Traumatisierung verbunden ist (MITTELMEIER 1992). In dieser Lokalisation sind die Implantate keiner physiologischen Belastung ausgesetzt. Die Bedingungen dienen jedoch als Modell für den Heilungsprozess von beschichteten Implantaten, die in der Einheilungszeit vor Belastungen geschützt werden müssen. Materialien, die sich im Modell als ungünstig erweisen, werden sich wahrscheinlich auch unter funktionellen Bedingungen nicht bewähren (THOMAS und COOK 1987).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 *Tiere und Implantatmaterialien*

3.1.1 *Tiere und Tierhaltung*

Die vorliegende Studie wurde mit 160 Kaninchen der Rasse *New Zealand White* ohne Vorzug eines Geschlechts (78 weibliche und 82 männliche) erarbeitet. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 4790g. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren die Kaninchen wenigstens 21 Wochen alt, um den Schluss der distalen Epiphysenfuge des Femur voraussetzen zu können (KAWEBLUM et al. 1994, RIVAS und SHAPIRO 2002).

Für eine ausreichende Adaptationszeit wurden sie mindestens 21 Tage vor dem geplanten Operationstermin aufgestellt. Die Unterbringung erfolgte in genormten Einzelboxen in klimatisierten Räumen bei 18°C Umgebungstemperatur und 60 % Luftfeuchtigkeit. Ein Beleuchtungsregime gemäß Tag- und Nachtrhythmus wurde durchgeführt. Die Ernährung der Tiere bestand in einem Diät- Alleinfuttermittel (*deukanin diät pellets*[®]), welches ad libitum angeboten wurde. Trinkwasser stand in Form von normalem Leitungswasser ebenfalls ständig zur Verfügung. Die Tierhaltung und die Einrichtungen für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden durch das Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gewährleistet. Das Versuchsvorhaben wurde im Rahmen des DFG-Projekts „Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz“ durch das Regierungspräsidium Dessau nachrichtlich Veterinäramt Halle/Saale am 15.12.2000 für 200 Tiere genehmigt (Amtliche Tierversuchsnummer: 42502/2-447 MLU HAL).

3.1.2 Implantate und Beschichtungen

Die Entwicklung der Ausgangsmaterialien sowie die Erarbeitung der Prozessführung für die Beschichtungsverfahren und die nachfolgende Charakterisierung der Keramikbeschichtungen erfolgte durch die Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM), Projektgruppe 0401-V-0165 Biowerkstoffe und Implantate, Berlin (GILDENHAAR et al. 2003a, Tab. 4 und 5).

Die Beschichtungen der Proben mit den Keramiken GB14, 602020, FA-CZP und Hydroxylapatit wurden als Dienstleistung am Institut für Mineralogie der Bergakademie Freiberg angefertigt. Als Verfahren kam das atmosphärische Plasmaspritzen zur Anwendung. Calciumtitanat wurde mit dem Verfahren der Salzbadbeschichtung (PLOSKA et al. 2003) in den Labors der Bundesanstalt auf die Metallkörper aufgebracht. Als Metallsubstrat wurde eine für biomedizinische Anwendungen gebräuchliche Ti6Al4V-Legierung der Firma DePuy Motech, Inc. verwendet. Diese zylindrischen Grundkörper haben einen Durchmesser von 4,00 mm und eine Länge von 20,00 mm. Sie wurden durch Aufrauen mit Korund (= Aluminiumoxid) der Korngröße 0,5–1 mm bei einem Strahldruck von 3 bar vorbehandelt.

Die Metallzylinder, auf denen Beschichtungen aufgebracht wurden, entsprechen in Form, Abmessungen, Material und Vorbehandlung denen, die unbeschichtet als Vergleich dienen sollten (Abb. 1).



Abb. 1: Ein Ti6Al4V Implantat mit aufgerauter Oberfläche und ein Keramik beschichtetes Implantat (oben)

Tab. 4: Zusammensetzung der Beschichtungsmaterialien

Name	Bestandteile in Massenprozent						kristalline Hauptphasen
	CaO	P ₂ O ₅	Na ₂ O	K ₂ O	MgO		
GB14	30,7	43,1	9,4	14,3	2,5		Ca ₂ KNa(PO ₄) ₂
602020	38,0	46,2	5,7	8,6	1,5		Ca ₁₀ Na(PO ₄) ₇ Ca ₅ Na ₂ (PO ₄) ₄
FA-CZP	31,2	42,9	--	--	--	4,5 CaF ₂ , 21,4 ZrO ₂	Ca ₅ (PO ₄) ₃ F, CaZr ₄ (PO ₄) ₆
Calciumtitanat (Ca₄Ti₃O₁₀)	48,35	--	--	--	--	51,65 TiO ₂	Ca ₃ Ti ₄ O ₁₀
Hydroxylapatit (HA)	55,8	42,4				1,8 H ₂ O	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH

Tab. 5: Charakterisierung der Implantatoberflächen und Beschichtungen

Name	Schichtdicke µm	Rauigkeit µm	Porosität %	Resorbierbarkeit (R) im Vergleich zu HA
GB14	145	56,9	9	R > HA
602020	135	73,3	15	R > HA
FA-CZP	100	61,2	14	langzeitstabil
Calciumtitanat (Ca₄Ti₃O₁₀)	1-2	5	0,5	langzeitstabil
Hydroxylapatit (HA)	120	58,4	18	R = 1
Ti6Al4V		10-15		nicht beschichtet
Ti6Al4V		glatt		nicht beschichtet

Eine Beschichtung mit Hydroxylapatit *Capital 90* der Firma PLASMA-BIOTAL Ltd. (GB) dient als Vergleich neben unbeschichteten aufgerauten und glatten Ti6Al4V- Zylindern. Glatte Ti6Al4V Zylinder wurden als Vergleich für Ausstoßversuche mitgeführt. Proben mit glatten Titanimplantaten wurden in der vorliegenden Studie nicht ausgewertet.

GB14 und 602020 sind durch ihren gegenüber HA erhöhten Alkaligehalt charakterisiert; bei FA-CZP wurde der Calciumorthophosphatstruktur Fluorapatit und Zirkonoxid zugefügt. GB14 und 602020 gelten als resorbierbar, während FA-CZP und Ca₄Ti₃O₁₀ zu den im biologischen Milieu

unlöslichen Materialien zählen. Die Plasmabeschichtung von Implantaten mit GB14, 602020, FA-CZP und HA ergab Schichtdicken zwischen 100 und 145 µm. Die mit einem Salzbadverfahren aufgebrachten Ca₄Ti₃O₁₀- Schichten betragen dagegen nur 1-2 µm.

Unterschiedliche Schichtdicken und chemische Eigenschaften (insbesondere Resorbierbarkeit) der einzelnen Beschichtungen erschwert deren direkten Vergleich untereinander. Für Ca₄Ti₃O₁₀ beschichtete Implantate bietet sich aus diesen Gründen und wegen der fast identischen Oberflächenstrukturierung ein Vergleich zu unbeschichteten aufgerauten Implantaten an. Aufgrund ähnlicher Schichtdicken und Resorbierbarkeiten der jeweiligen Keramiken ist eine Gegenüberstellung von GB14- und 602020- bzw. FA-CZP- und HA- Beschichtungen sinnvoll. Im Folgenden werden deshalb GB14 mit 602020, FA-CZP mit HA sowie Ca₄Ti₃O₁₀ mit unbeschichteten aufgerauten Ti6Al4V Implantaten verglichen.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Einteilung der Versuchsgruppen

Die Implantate mit den unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien wurden in jeweils fünf Zeiträumen (2, 4, 6, 12 und 24 Wochen) getestet. Damit sollen Initial-, Reparations- und Stabilisierungsphase der Einheilung erfasst werden. Um einen statistisch verwertbaren Datenpool zu erhalten, betrug die Gruppengröße pro Zeitraum und Beschichtung jeweils acht Tiere. Innerhalb einer Gruppe erhalten alle acht Tiere ein Implantat mit der jeweiligen Beschichtung (GB14, 602020, FA-CZP, Ca₄Ti₃O₁₀) und auf der Gegenseite wird bei vier Tieren ein Probekörper mit HA-Beschichtung implantiert und vier Tiere erhalten ein reines Ti6Al4V-Implantat das entweder aufgeraut ist (bei Tieren mit 602020 und FA-CZP) oder eine unbehandelt glatte Oberfläche (bei Tieren mit GB14 und Calciumtitanat) hat. (Ein Versuchsplan in Tabellenform befindet sich im Anhang: Anlage 1, Seite I.)

3.2.2 Operation

Die Implantation der Probekörper wurde in Allgemeinnarkose durchgeführt. Nach subkutaner Injektion einer Mischung aus Medetomidinhydrochlorid (*Domitor*[®]) und Ketaminhydrochlorid (*Ursotamin*[®]), in einer Dosierung von 0,25 ml *Domitor*[®]/kg KM und 0,2 ml *Ursotamin*[®]/kg KM, wurde gewartet bis das Toleranzstadium für chirurgische Eingriffe erreicht war. Über die Ohrvene wurde ein venöser Zugang geschaffen, um das Tier intra operationem mit physiologischer Kochsalzlösung (*NaCl* 0,9 %, *Braun*[®]) zu infundieren und im Bedarfsfall die Narkose intravenös verlängern zu können. Die Vorbereitung des Operationsfeldes folgte der üblichen chirurgischen Praxis, um ein Arbeiten unter sterilen Kautelen zu gewährleisten.

Der Zugang zum distalen Femur erfolgte von medial. Nach palpatorischem Aufsuchen des Gelenkspaltes des Kniegelenks und des Epicondylus medialis femoris (KOCH und BERG 1992) wurde eine Incision der Haut von ca. 2 cm Länge proximal des Gelenkspaltes über dem Epicondylus parallel zur Femurlängsachse gesetzt. Durch teils stumpfes, teils scharfes Präparieren wurde der proximale Ansatz des Ligamentums collaterale mediale gewebeschonend dargestellt. Dieser diente optisch zur Orientierung für die Implantation der Probekörper. Das Periost wurde nun mittels Rasparatorium unmittelbar proximal vom Ansatz des Lig. collaterale mediale abpräpariert und die knöcherne Oberfläche des medialen Epicondylus femoris so dargestellt.

Der Bohrlochdefekt soll ins Zentrum der Metaphyse, parallel zu den Femurkondylen, quer zur Längsachse des Oberschenkels gesetzt werden. Um eine exakte Platzierung der Bohrung für das Implantat zu erreichen, wurde zunächst ein Bohrdrabt von 1,25 mm Ø als Führung in dieser Lokalisation eingebracht. Dann wurde mit einem kanülierten Bohrer von 4,2 mm Ø (für unbeschichtete Implantate und Calciumtitanat) bzw. 4,5 mm Ø (für alle anderen Beschichtungen) der Knochen unter Fingerschutz bis zum Durchstoßen der Gegenkortikalis durchbohrt. Nach Spülung der Öffnung wurde das jeweilige Implantat *press fit* eingesetzt (Abb. 2 und 3). Nach visueller und palpatorischer Kontrolle der Lage des Probekörpers erfolgte der Wundverschluss. Die Wunden wurden anschließend durch einen Pflasterverband geschützt.



Abb. 2: Operationssitus Bohrlochdefekt



Abb. 3: *Press fit* eingesetzter Probekörper intra operationem

3.2.3 *Postoperative Versorgung und Kontrolle*

Zur Schmerzbehandlung wurden den Kaninchen postoperativ und an den drei folgenden Tagen zweimal täglich jeweils 50 mg Tramadolhydrochlorid (*Tramal[®] 100 mg Injektionslösung*) subkutan injiziert. Die Kaninchen wurden unmittelbar nach der Operation in ihre gewohnte Umgebung zurückgebracht. Die Tiere konnten die Gliedmaßen voll belasten.

Täglich erfolgte eine visuelle Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere. Die Wundheilung wurde in den ersten 3 Tagen nach der Operation täglich, später wöchentlich befundet.

3.2.4 *Polychrome Sequenzmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen*

Durch MILCH et al. (1958) wurde erstmals beschrieben, dass sich Tetrazykline histologisch als Indikatoren für neu gebildeten Knochen eignen. Nach Anwendung des Antibiotikums Tetrazyklin wurde eine typische Fluoreszenz des Knochens unter ultraviolettem Licht beobachtet, speziell in den Bereichen, die sich zum Zeitpunkt der Verabreichung im Aufbau befanden. In Anlehnung an RAHN (1976) wurde in dieser Arbeit eine Vierfarbmarkierung mit folgenden Farbstoffen durchgeführt: Tetrazyklin – Xylenolorange – Calcein – Alizarinkomplexon (Tab. 6).

Tab. 6: Markierung mit Fluorochromen

Farbstoff	Zeitpunkt	Dosis	Farbe
Tetrazyklin	unmittelbar post op.	25 mg/kg KM	gelb
Xylenolorange	14 Tage post op.	80 mg/kg KM	orange
Calcein	28 Tage post op.	10 mg/kg KM	grün
Alizarinkomplexon	42 Tage post op.	30 mg/kg KM	rot

Die Farblösungen wurden jeweils am Tag der Verabreichung nach folgendem Schema hergestellt: Die entsprechende Menge Farbstoff wird in 2-prozentiger NaHCO₃ Lösung gelöst. Der pH -Wert der Injektionslösung wird anschließend auf 7,2 eingestellt und einer Sterilfiltration unterzogen. Die Applikation der Farbstofflösung (jeweils 1ml/kg KM) erfolgte subkutan. Eine Auswertung der Fluoreszenzmarkierung wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

3.2.5 Probenentnahme und Aufbereitung

3.2.5.1 Euthanasie und Probenentnahme

Nach der jeweiligen Versuchsdauer wurden die Kaninchen eingeschläfert. Die Euthanasie folgte den Empfehlungen von FEHR (2002), mit der Ausnahme, dass nicht gebrauchsfertige Pentobarbitallösung zur Anwendung kam, sondern jeweils eine Lösung aus Pentobarbitaltrockensubstanz (Pentobarbital-Natriumsalz, Firma Sigma-Aldrichchemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Braun®) in einer Konzentration von 200 mg pro ml angefertigt wurde.

Das Gewicht des Tieres am Versuchsende wurde ermittelt. Anschließend wurden beide Femora frei präpariert und jeweils eine Gewebeprobe von Weichgewebe aus der Umgebung des Implantats entnommen. Nach Exartikulation des Kniegelenks wurde der Femur im distalen Drittel abgesetzt. Bei einem Kaninchen pro Implantatgruppe und Zeitraum wurden zusätzlich Proben von Leber und Niere für die histologische Aufarbeitung gewonnen. Die Weichgewebeproben wurden in gepuffertes Formalin verbracht.

Abb. 4 zeigt eine Röntgenaufnahme der gesamten Hintergliedmaße eines Kaninchens zur Veranschaulichung der Topographie des Implantationsortes. Abb. 5: durch eine Röntgenaufnahme der Knochenproben wurde die korrekte Position des Implantats kontrolliert.



Abb. 4: Röntgendarstellung der Hinterextremität eines Kaninchens, links



Abb. 5: Röntgendarstellung, Lage der Probekörper im Knochen

3.2.5.2 Probenaufarbeitung

Die implantattragenden Knochen wurden nach kurzfristiger Zwischenlagerung bei -80°C für nachfolgende Untersuchungen aufgearbeitet: Für Ausstoßversuche wurden zunächst drei Knochenscheiben parallel zu Femurlängsachse gewonnen. Die verbleibende Hälfte der Probe stand zur Aufarbeitung für histologische Fragestellungen zur Verfügung.

3.3 *Herstellung von Dünnschliffen für Histologie und Histomorphometrie*

3.3.1 *Entwässerung und Einbetten der Knochenproben*

Für die Aufarbeitung der Knochenproben zu histologischen Präparaten wurde das Verfahren der Kunststoffeinkbettung (DICKSON 1984, DONATH 1988) verwendet, das die Verarbeitung von unentkalktem Knochen erlaubt. Der Kunststoff, Methylmethacrylat (MMA, *Technovit 9100*[®]), durchdringt das Gewebe gleichmäßig und polymerisiert durch Wärme und unter Zugabe eines Polymerisationsstarters zu Polymethylmethacrylat, so dass ein homogener schneid- bzw. sägbarer Probenblock entsteht. Durch Zusatz von Weichmacher (Dibuthylphthalat) kann der Härtegrad des Polymerisates an die Konsistenz des Knochens angepasst werden. Das ist notwendig, um Brüche und Ablösungen an der Kontaktzone des Kunststoffs zum Knochen bei der Weiterverarbeitung zu verhindern. Vor der Einbettung in MMA ist eine sorgfältige Entwässerung und Entfettung der Proben Bedingung. Die Präparate wurden dazu in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und mit Xylolersatz (*Histoclear*[®], Firma Shandon) entfettet (Tab. 7).

Tab. 7: Entwässerung/ Entfettung der Knochenproben

Reagenz	Zeit (Tage)
Ethanol 70 %	mind.3*
Ethanol 95 -96 %	3
Ethanol 100 %	2
Ethanol 100%	2
<i>Histoclear</i> [®]	2
<i>Histoclear</i> [®]	2

* die Flüssigkeit ist insbesondere bei Trübungen mehrmals zu wechseln

Nach dieser Prozedur wurden die Proben schrittweise in MMA eingebettet, um eine vollständige Infiltration mit dem Kunststoff zu gewährleisten. Als Einbettformen dienen Gläser mit luftdicht verschließbaren Deckeln. Die Präparate müssen stets vollständig mit der Flüssigkeit bedeckt sein.

Die Einbettung wurde nach dem in Tab. 8 aufgeführten Schema durchgeführt:

Tab. 8: Einbettung der Knochenproben in MMA

	MMA-Lösung	Dibuthylphtalat (Weichmacher)	Benzoylperoxid (Polymerisationsstarter)	Dauer
MMA 1	100 ml			5 Tage
MMA 2	95 ml	5 ml	1 g	3 Tage
MMA 3	95 ml	5 ml	3 g	bis zur Aushärtung



Abb. 6: Implantattragende Knochenprobe in MMA

3.3.2 Herstellung von Dünnschliffen

Aus den eingebetteten Gewebeblöcken (Abb. 6) wurden mit der Trenn-Dünnschliff-Technik modifiziert nach DONATH (1988) Dünnschliffe für die histologische Auswertung hergestellt. Dafür stehen spezielle Geräte zur Verfügung:

- *Exakt*-Trennschleifsystem,
- *Exakt*-Mikroschleifsystem,
- *Exakt*-Präzisionsklebepresse (alle *EXAKT*-Apparatebau, Norderstedt).

Zunächst wurden die Proben mit dem Trennschleifsystem, das eine wassergekühlte Diamant-Bandsäge darstellt, in fünf Scheiben von ca. 800 µm Dicke gesägt (Abb. 7). Die Ebene der Schnitte liegt dabei senkrecht zur Implantatlängsachse. Diese werden auf einen Plexiglasobjektträger aufgeklebt und mit dem Mikroschleifsystem (Nassschleifverfahren mit Spezialschleifpapier) auf ca. 70 bis 110 µm Dicke geschliffen. Die Oberfläche wird innerhalb dieses Arbeitsganges anschließend poliert.

So hergestellte Dünnschliffe (Abb. 8) wurden sowohl für histologische Oberflächenfärbungen als auch für die Fluoreszenz-Mikroskopie genutzt.

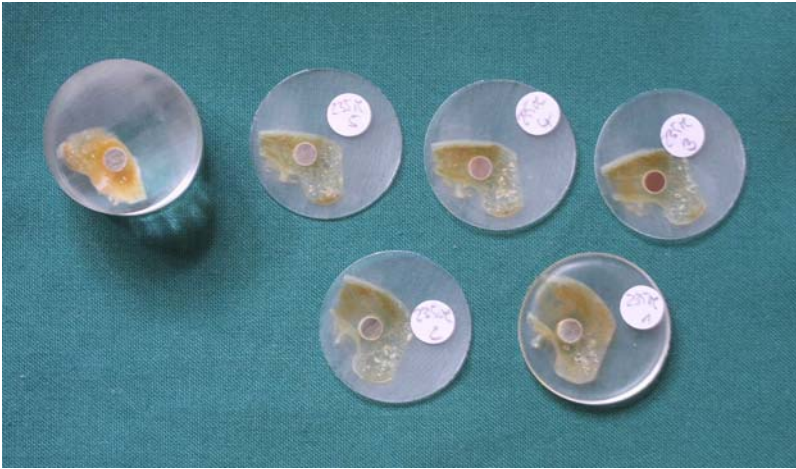


Abb. 7: Gewebblock (links) und fünf Schnitte



Abb. 8: Zwei Dünnschliffe für histologische Färbungen

3.4 *Histologische Oberflächenfärbungen, Lichtmikroskopie und Histomorphometrie*

3.4.1 *Histologische Färbungen*

3.4.1.1 **Masson - Trichrom - Goldner - Färbung**

Die Trichromfärbung nach GOLDNER eignet sich für die bildanalytische Auswertung histologischer Präparate und wird im Labor für Experimentelle Orthopädie standardmäßig für diese Fragestellungen genutzt. Mit Hilfe dieser Färbemethode wird eine gute Differenzierung unverkalkter Knochenmatrix und Weichgewebe gegenüber der mineralisierten Knochensubstanz erreicht. Die Farben der entsprechenden Strukturen sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Darstellung der zellulären und extrazellulären Strukturen bei der Masson-Trichrom-Goldner- Färbung

Färbung	Zytoplasma	Erythrozyten	Osteoid/ Bindegewebe	mineralisierter Knochen	verkalkte Knorpelmatrix
Masson – Trichrom- Goldner	rötlich- braun	orange	rotorange	grün	hellgrün

Die Färbung der Präparate erfolgte modifiziert nach ROMEIS (1989) nach folgendem Schema:

1. nicht entplastete Knochenschliffe 2 min in Ameisensäure 0,1 % anätzen
2. in Leitungswasser spülen
3. für 2h in Methanol 20 %
4. in Leitungswasser spülen
5. 7 min färben in Säurefuchsin-Ponceau (Masson Lösung, Goldner I)
6. spülen in Essigsäure 2 %
7. 5 min färben mit Phosphorwolframsäure-Orange-G
8. spülen in Essigsäure 2 %
9. 10 min färben in Lichtgrün bei 60° im Brutschrank
10. spülen in Essigsäure 2 %
11. Auswaschen in Aqua dest.
12. Entwässern nacheinander mit 70 %, 96 %, absolut. Ethanol
13. kurz durch Xylol schwenken
14. Eindecken mit Kanadabalsam

3.4.1.2 Giemsa-Färbung

Die Oberflächenfärbung nach GIEMSA (ROMEIS 1989) lässt eine eingehende Beurteilung der Gewebestrukturen zu. Sie liefert einen guten Farbkontrast zwischen Zellen und der Interzellulärsubstanz auch im Hartgewebe und wird deshalb für die qualitativ histologische Beurteilung der Präparate genutzt. Tab. 10 benennt die farbliche Darstellung der jeweiligen Gewebsstrukturen.

Tab. 10: Darstellung der zellulären und extrazellulären Strukturen bei der Giemsa-Färbung

Färbung	<i>Osteoblasten</i>	<i>Osteoklasten</i>	<i>Osteoid/ Bindegewebe</i>	<i>alter Knochen</i>	<i>neu gebildeter Knochen</i>
Giemsa	blau	blau	blassblau	zartrosa	rosa

Die Dünnschliffpräparate wurden nach folgendem Schema gefärbt:

1. nicht entplastete Knochenschliffe 2 min in Ameisensäure 0,1 % anätzen
2. in Leitungswasser spülen
3. für 2h in Methanol 20 %
4. in Leitungswasser spülen
5. 30 min färben in Giemsalösung 1:10 bei 60° im Brutschrank
6. spülen in Aqua dest.
7. spülen in Essigwasser (8 Tropfen Eisessig auf 100 ml Aqua dest.) bis der blaue Farbüberschuss verschwindet und die Schliffe rötlich erscheinen
8. Entwässern nacheinander mit 70 %, 96 %, absolut. Ethanol
9. kurz durch Xylol schwenken
10. Eindecken mit Kanadabalsam

3.4.2 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Forschungsmikroskop (Typ *Vanox AH3*) der Firma *Olympus* durchgeführt. Die mittlere Vergrößerung während der histologischen Beurteilung der Dünnschliffe lag dabei bei 1: 500.

Diese Vergrößerungen errechnen sich aus folgenden Faktoren:

- Objektiv = 10-40
- Fluoreszenzblock = 1,25
- Okular = 10

3.4.3 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie bietet die Möglichkeit zur quantitativen Beurteilung histologischer Präparate. Zur Untersuchung kam ein repräsentativer Schliff aus der Spongiosa jeder Knochenprobe (zwei pro Tier).

Die Erhebungen wurden mit Hilfe des vollautomatischen Bildanalysesystems *KS 300* (Firma *Carl Zeiss Vision GmbH*, Deutschland) durchgeführt. Mikroskopische Bilder der Schliffpräparate wurden über einen Videoaufsatz an einem Lichtmikroskop (Typ *Axioplan*, Firma *Carl Zeiss Vision GmbH*, Deutschland) digitalisiert. Über den *HLS* Modus, der im System zur Verfügung steht, ist es möglich, eine digitale Kopie zu erzeugen, die dem tatsächlich sichtbaren Bild qualitativ nahe kommt. Das ursprüngliche Farbbild (Echtfarbmodus *RGB*) wird im *HLS* Modus in drei Grauwertbilder mit jeweils 24 Bit Farbtiefe zerlegt. Farbintensität und Farbsättigung können dabei zusätzlich getrennt geregelt werden. Somit wird die Farbanpassung für die Bildverarbeitung besser möglich.

Die histologischen Strukturen wurden mit 100facher Vergrößerung dargestellt. Um den gesamten Implantatumfang inklusive des umliegenden Gewebes in einer Darstellung zu berücksichtigen, war es notwendig, Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammenzusetzen. Das wurde über einem am Lichtmikroskop installierten und über die *KS 300* steuerbaren Scanningtisch (Firma *Merzhäuser*, Wetzlar, Deutschland) realisiert. Für die Bilderstellung musste das Präparat zunächst zentriert werden, um das Implantat unter entsprechender Steuerung des Scanningtisches im Zentrum des endgültigen Bildes zu platzieren. Insgesamt wurden so 48 Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt, was einer Größe des Ausgabebildes von 2238 x 2240 Pixeln entspricht.

Die auf diese Weise erzeugten Bilder stehen nun der vollautomatischen Bildanalyse *KS 300* zur Verfügung. In Zusammenarbeit mit der Firma (*Carl Zeiss Vision GmbH*) wurde dafür ein speziell an die Präparate angepasstes Makro erstellt. Über einzelne Segmentierungsschritte ist es damit möglich, verschiedene Strukturen zu trennen. Kriterium für deren Zuordnung ist die jeweilige Farbe im sichtbaren Bild, die im Falle des Gewebes durch die Goldner-Färbung bestimmt wird. In Einzelschritten werden den jeweiligen Komponenten (Knochen, Osteoid etc.) bestimmte Grauwerte zugeordnet. Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Klasse wird durch ein grafisches Overlay gekennzeichnet, das heißt einem bestimmten Bereich von Grauwerten wird eine Falschfarbe zugeordnet. Dem Untersucher dient dieses Verfahren als interaktiver Kontrollmechanismus, welches ihn in die Lage versetzt, die exakte Erfassung relevanter Strukturen zu kontrollieren und Artefakte aus der Messung auszuschließen. Aus der Segmentierung wird ein Binärbild der jeweiligen Struktur erzeugt und durch binäre Bildoperationen korrigiert. Die Software gibt dabei die Messbedingungen vor, die somit für alle untersuchten Präparate gleich sind.

Durch die Falschfarben legt der Untersucher die Parameter fest. Nacheinander werden Implantat, Osteoid und Knochen markiert. Bei Implantaten, die mit resorbierbaren Materialien (602020 und GB14) beschichtet sind, wird zusätzlich die Beschichtung miterfasst, weil es dort zeitabhängig zu

Veränderungen kommt. Festgelegt wird zusätzlich die sog. *ROI (Region of Interest)* mit dem Implantat im Zentrum, deren Durchmesser 850 Pixel beträgt. Innerhalb dieser Messzone werden die morphometrischen Daten erhoben. Eine Darstellung der einzelnen Sequenzierungsschritte an einem Beispiel findet sich im Anhang: Anlage 2, Seite II-IV.

Zur Charakterisierung der Knochenneubildung und Knochenreifung wurden in Anlehnung an PARFITT (1988) folgende Parameter bestimmt:

1. Der Anteil mineralisierter Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes (BV/TV) in %

Der Anteil des Knochens innerhalb der *ROI* wird dazu ins Verhältnis zur Gesamtfläche abzüglich des Implantatanteils gesetzt.

2. Der Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (Osteoid/Os) in %

Der Anteil Osteoid innerhalb der *ROI* wird ins Verhältnis zum Knochenvolumen (mineralisierte Knochensubstanz) innerhalb des Messfeldes gesetzt. Die Größe wird als Osteoid/Os bezeichnet. Sie ist ein Maß für den Mineralisierungsgrad und somit für die Reifung des Knochens. Dabei gilt: je höher der Anteil Osteoid, desto niedriger ist der Mineralisierungsgrad.

3. Die Implantatkontaktfläche (Kont.) in %

Grundlage der Berechnung aller Kontaktflächen war der Anteil des Implantatumfanges der mit Knochen (oder Osteoid) bedeckt war.

Für die langzeitstabilen Beschichtungen (FA-CZP, Ca₄Ti₃O₁₀) und Ti6Al4V Implantate wurden Beschichtung und Metall gleichgesetzt, so dass nur eine Kontaktfläche Implantat zum mineralisierten Knochen bestimmt wurde. Durch erhebliche zeitabhängige Gefügeveränderungen innerhalb der Schichten wurden bei den resorbierbaren Materialien zusätzlich jeweils zwischen Kontaktfläche zur Beschichtung oder zum Metall des Grundkörpers unterschieden. Außerdem wurde das kontaktierende Gewebe (Osteoid oder Knochen) differenziert. Daraus ergeben sich für die jeweiligen Beschichtungen folgende Parameter, die die Kontaktflächen zwischen Gewebe und Implantatoberfläche charakterisieren.

Für FA-CZP, Ca₄Ti₃O₁₀, HA und Ti6Al4V:

Kont = Kontaktfläche Knochen-Implantat in %.

Für GB14 und 602020:

Kont_Be_Os = Kontaktfläche Knochen zur Beschichtung in %

Kont_Be_Osteoid = Kontaktfläche Osteoid zur Beschichtung in %

Kont_Met_Os = Kontaktfläche Knochen zu Metall in %

Kont_Met_Osteoid = Kontaktfläche Osteoid zu Metall in %.

3.5 Statistik

Zur graphischen Darstellung und statistischen Aufarbeitung der histomorphometrisch gewonnenen Ergebnisse wurden die Daten in das Datenverarbeitungsprogramm *SPSS für Windows 11,5* (SPSS Deutschland GmbH, München) übertragen. Alle Proben wurden dreimal gemessen. Die Werte der Messwiederholungen gehen gemittelt in die statistische Auswertung ein. Grundlage der Berechnung stellen Verhältnisgrößen dar, die ohne Berücksichtigung von Maßeinheiten bestimmt wurden. Die einzelnen Parameter zweier unterschiedlicher Implantatmaterialien wurden im zeitlichen Kontext miteinander verglichen.

Nach SACHS (1992) sowie JANSEN und LAATZ (2003) gelten folgende Voraussetzungen: Die Stichproben sind unabhängig voneinander und eine Normalverteilung liegt aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht vor. Geprüft werden soll die zentrale Tendenz der Unterschiede zwischen jeweils zwei Beschichtungen innerhalb eines Zeitraums. Unter diesen Bedingungen wurde der Mann-Whitney U-Test für den Vergleich der Mittelwerte herangezogen. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test, als schärferes Kriterium, wurde zusätzlich mitgeführt. Im Anhang (Anlage 3, Seite V – XXX) findet sich eine Aufstellung beider Tests.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsverlauf

Der experimentelle Teil der Studie wurde vom 26.04. 2002 bis 21.04.2003 durchgeführt. Bei einem Kaninchen mit 602020 beschichtetem Implantat und vierwöchiger Versuchsdauer musste aufgrund einer Exostose im Bereich der Operationsstelle auf eine Implantation des Kontrollimplantates mit HA Beschichtung verzichtet werden (Tab. 11). Zwei Tiere aus Gruppen mit 24 Wochen Implantationszeit verstarben in der 15. bzw. 17. Versuchswoche und mussten ersetzt werden. Innerhalb des Versuchs traten keine Störungen des Allgemeinzustands der Tiere auf, die mit der Implantation der Probekörper assoziiert waren. Wundheilungsstörungen sowie makroskopische Entzündungszeichen im Bereich der Implantationsstellen wurden nicht festgestellt. Auch die Gewebeproben aus der Umgebung der Implantate wiesen histologisch keine Hinweise auf Implantat assoziierte Reaktionen auf. Bei längeren Versuchszeiten (12 und 24 Wochen) waren in der Regel Gewichtszunahmen bei den Tieren zu verzeichnen. Die Röntgenkontrollen der Probekörper ergaben in einem Fall eine unkorrekte Lage des Implantats in der Markhöhle, was zum Ausschluss der Probe führte. Bei einigen Präparaten entstanden bei der Probenaufarbeitung Artefakte (ROMEIS 1989). Diese Präparate mussten von der Histomorphometrie ausgeschlossen werden (Tab. 11).

Tab. 11: Ausschluss von Präparaten für die Histomorphometrie und daraus resultierende Gruppengrößen

Material	Implantat	Zeitraum	Begründung	Anzahl der Proben reduziert
Ti6Al4V	151 links	6 Wochen	Verlust des Implantats bei Probenaufarbeitung	N = 6
Ti6Al4V	163 links	6 Wochen	Lufteinschlüsse im Kunststoff	N = 6
HA	137 links	4 Wochen	nicht implantiert	N = 15
HA	009 links	12 Wochen	Implantat in Markhöhle	N = 13
HA	051 rechts	12 Wochen	Färbeartefakte	N = 13
HA	054 rechts	12 Wochen	Färbeartefakte	N = 13
HA	126 links	24 Wochen	Färbeartefakte	N = 15
GB14	017 rechts	12 Wochen	Färbeartefakte	N = 7
602020	094 rechts	2 Wochen	Lufteinschlüsse im Kunststoff	N = 7

4.2 Histologische Beurteilung der Schliffpräparate im zeitlichen Kontext

4.2.1 Implantate mit GB14 Beschichtung

4.2.1.1 Implantationsdauer 2 Wochen

Mikroskopisch ist die Ausdehnung des Bohrlochdefekts noch sichtbar (Abb. 9). Um das Implantat herum hat sich vom Wirtsknochen ausgehend ein dichtes Netz Faserknochen ausgebildet (Abb. 9 und 10). Die zarten Knochenbälkchen besitzen einen relativ breiten Osteoidsaum, den aktive Osteoblasten auf dessen Oberfläche begleiten (Abb. 10). Dabei liegt mineralisierter Knochen der Beschichtung ohne trennende Bindegewebsschicht direkt auf (Abb. 10 und 11).

Die Beschichtung weist innerhalb eines Schliffes oft unterschiedliche Dicken auf und platzt bei einem Teil der Proben großflächig vom Metallsubstrat ab. Diese Bruchstücke werden von Knochen umschlossen (Abb. 11).

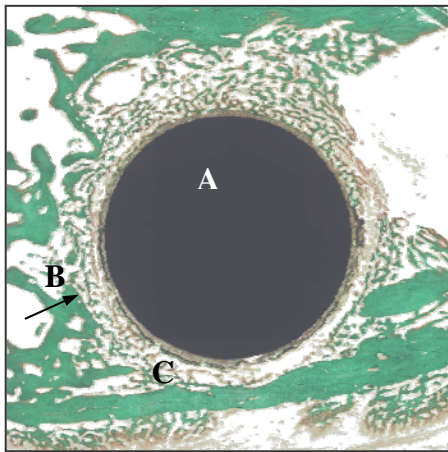


Abb. 9: Präparat mit GB14 Beschichtung 2 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner-Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** Grenze des ehemaligen Bohrlochdefekts daran anschließend netzförmige Faserknochenstruktur (**C**)

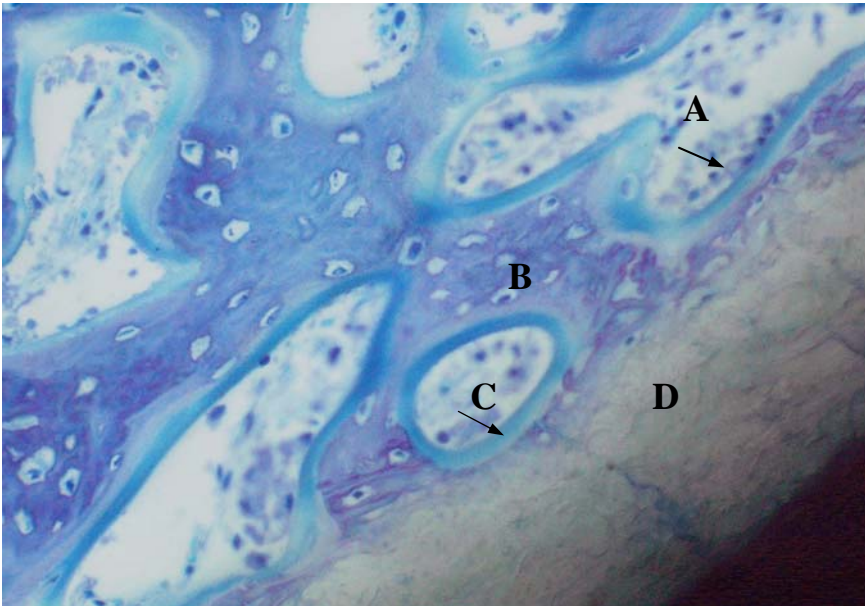


Abb. 10: Präparat mit GB14 Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: aktive Osteoblasten, B: neu gebildeter Faserknochen,
C: Osteoid, D: Keramikbeschichtung

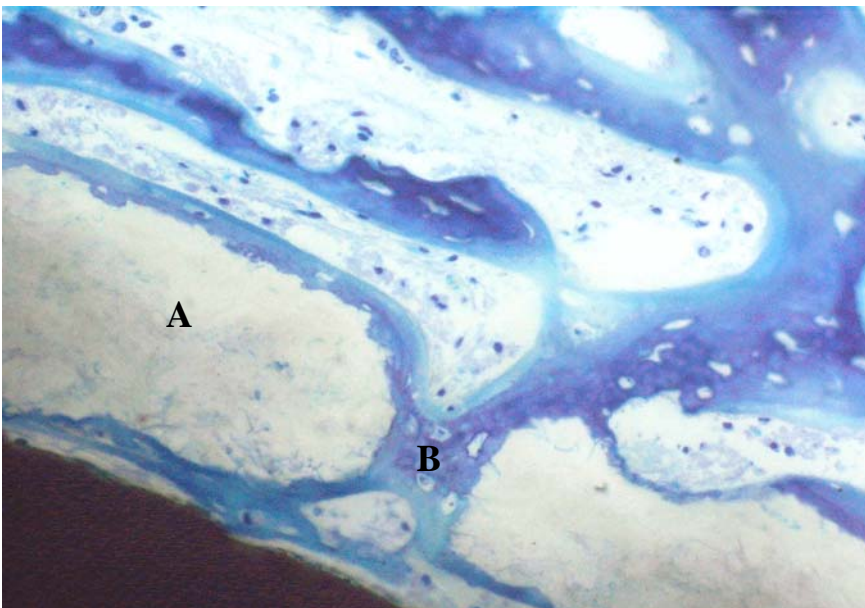


Abb. 11: Präparat mit GB14 Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: abgeplatzte Beschichtung, B: umgebender Faserknochen

4.2.1.2 Implantationsdauer 4 Wochen

Der Beschichtung liegen Knochenbälkchen flächenhaft auf. Innerhalb des neu gebildeten Knochens erscheinen die Trabekel jetzt kompakter. Die Organisation zu Lamellenknochen beginnt (Abb. 12 und 13).

Innerhalb der Schicht sind deutliche Resorptionserscheinungen in Form von Kratern und Löchern zu sehen (Abb. 12). Die Substanzverluste reichen in einzelnen Abschnitten der Implantatoberfläche bis auf das Metall und werden mit zellreichem Granulationsgewebe aufgefüllt (Abb. 13). Außerdem treten im Gefüge der Beschichtung mikroskopisch sichtbare Brüche auf (Abb. 12 und 13).

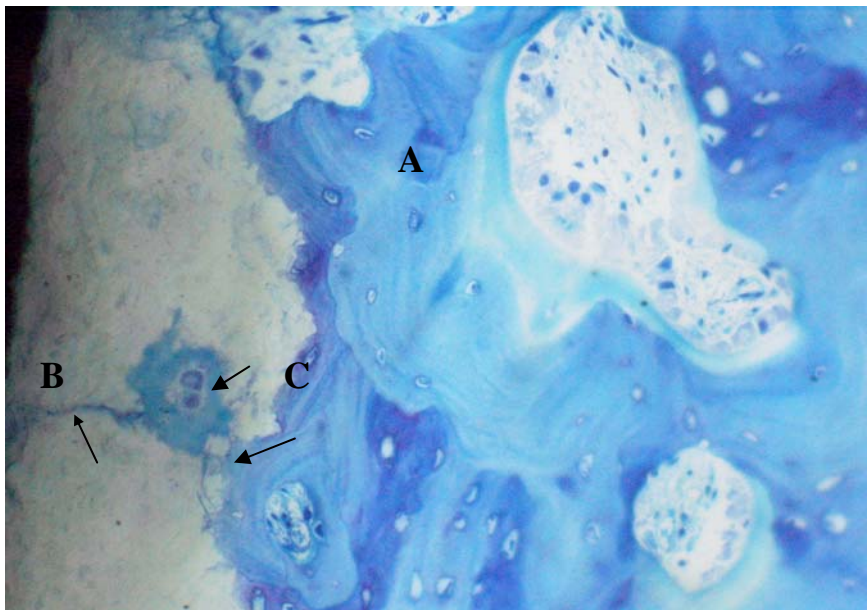


Abb. 12: Präparat mit GB14 Beschichtung 4 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Knochen, **B:** Bruch innerhalb der Keramikbeschichtung,

C: Substanzverluste der Keramikbeschichtung

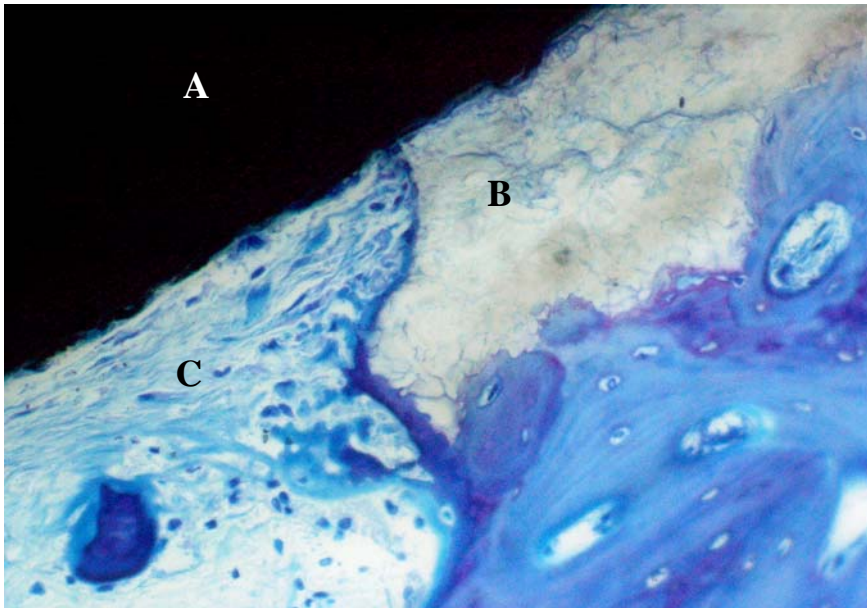


Abb. 13: Präparat mit GB14 Beschichtung 4 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Metall, B: Beschichtung, C: Granulationsgewebe

4.2.1.3 Implantationsdauer 6 Wochen

Die Knochenbälkchen innerhalb der Zone neu gebildeten Knochens nehmen im Zuge des *Remodeling* im Vergleich zu den frühen Zeiträumen zahlenmäßig ab.

Die GB14 Keramik unterliegt fortschreitender Resorption und die Substanzdefekte innerhalb der Beschichtung werden mit mineralisiertem Knochengewebe aufgefüllt (Abb. 14).

Der Keramik liegt großflächig Lamellenknochen auf (Abb. 15). Von auf der Oberfläche der Beschichtung aufsitzenden Knochenbälkchen ausgehend, wird eine schmale Knochenlamelle um das Implantat herum gebildet.

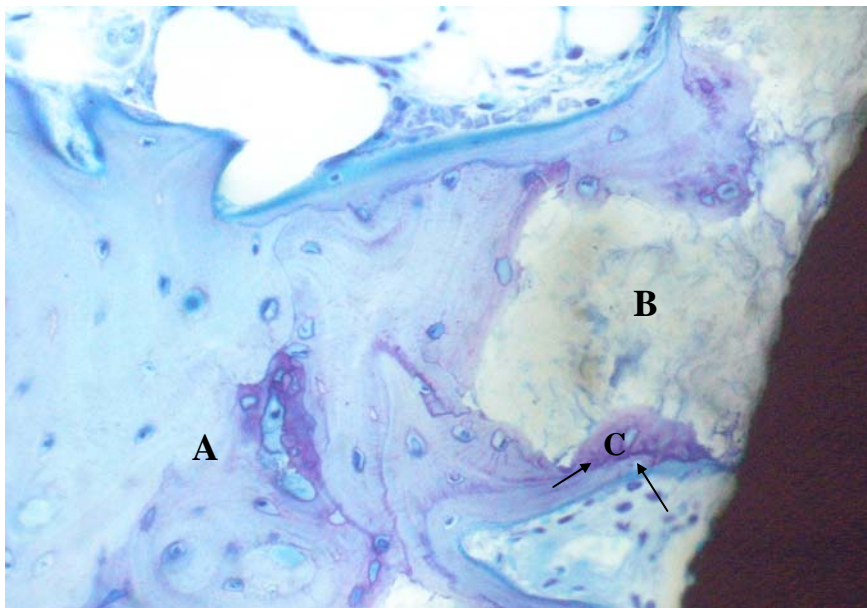


Abb. 14: Präparat mit GB14 Beschichtung 6 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Knochenbälkchen, B: Rest der Beschichtung, C: Resorptionszone der Keramik mit neu gebildetem Knochen

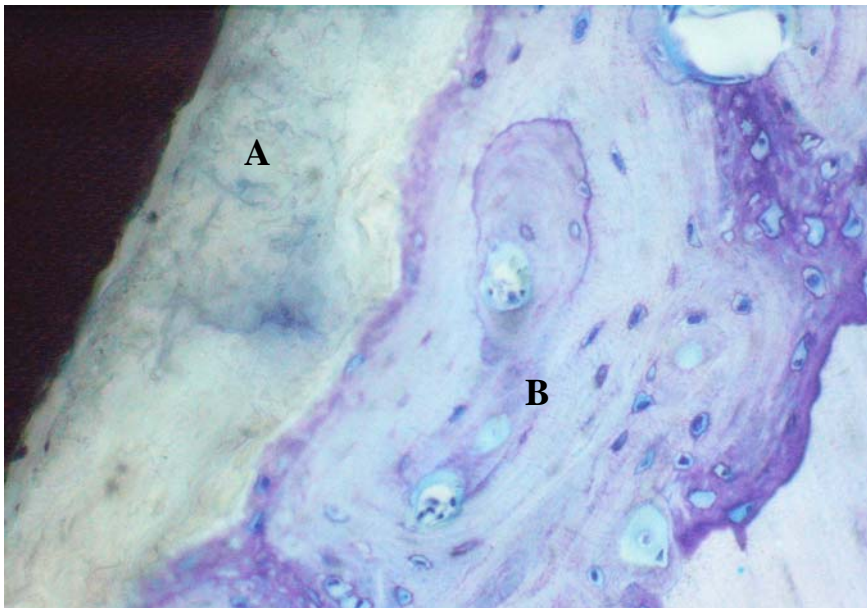


Abb. 15: Präparat mit GB14 Beschichtung 6 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Beschichtung, B: Knochenlamelle aus reifem Knochen

4.2.1.4 Implantationsdauer 12 Wochen

Reifer Lamellenknochen liegt der Beschichtung auf und innerhalb der lakunenähnlichen Resorptionszonen nimmt Knochengewebe in Form von Faserknochen mit dem Metallsubstrat des Implantats Verbindung auf (Abb. 16 und 17).

Einzelne große Partikel bzw. kompakte Schollen der Keramik heben sich von ihrer Unterlage ab und werden in Knochentrabekel eingeschlossen (Abb. 16).

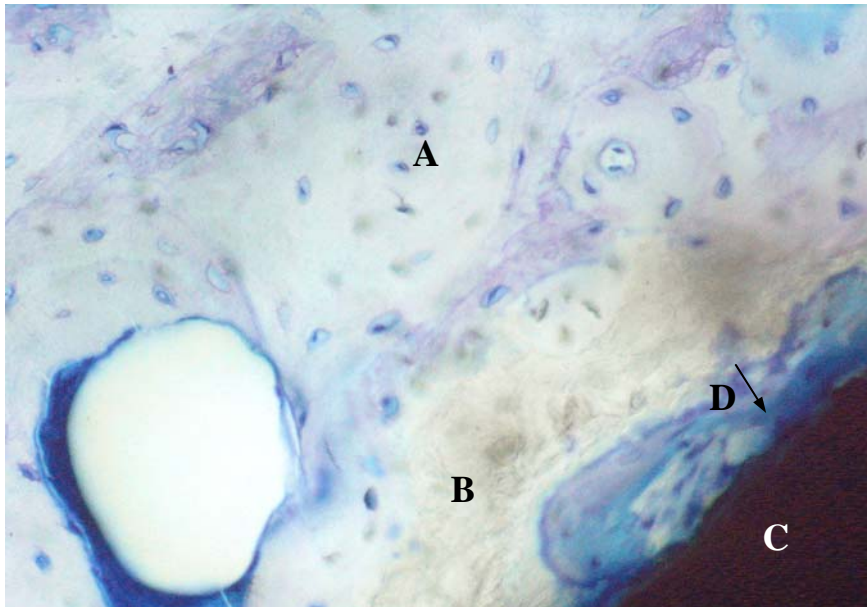


Abb. 16: Präparat mit GB14 Beschichtung 12 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Lamellenknochen, B: Beschichtung, C: Metall, D: Faserknochen

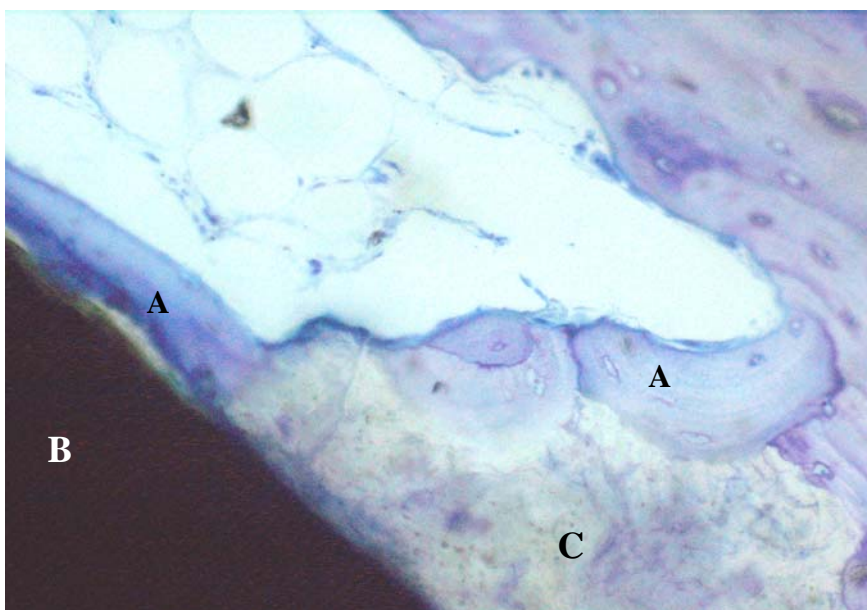


Abb. 17: Präparat mit GB14 Beschichtung 12 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250, A: Knochen, B: Metall, C: Beschichtung

4.2.1.4 Implantationsdauer 24 Wochen

Auch auf dem Metallkern der Beschichtung liegt Lamellenknochen ohne trennende Bindegewebsschichten direkt auf.

Schollenartige Reste der Beschichtung werden in Knochentrabekel inkorporiert (Abb. 18). Das Implantat wird über mehrere große Knochentrabekel zur Peripherie hin abgestützt (Abb.19).

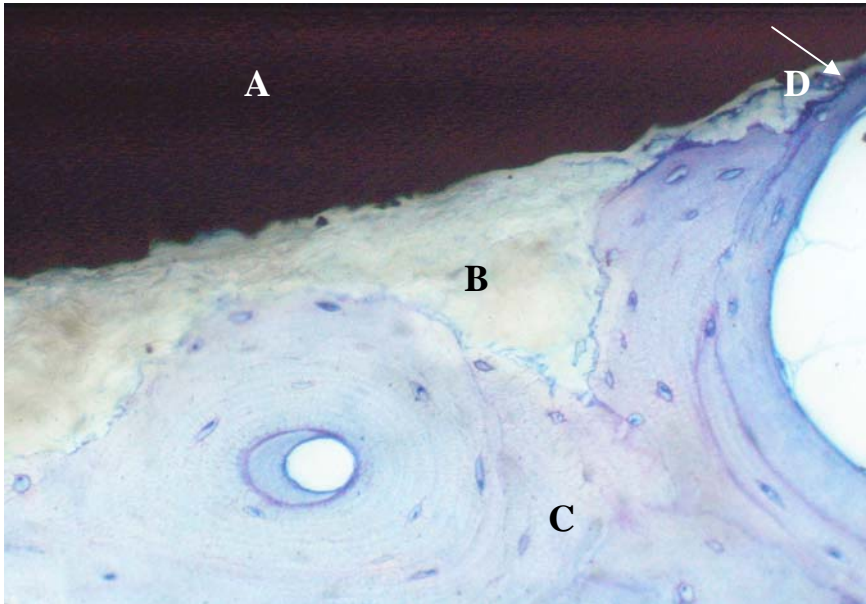


Abb. 18: Präparat mit GB14 Beschichtung 24 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Metall, B: Rest der Keramikbeschichtung, C. Knochentrabekel,
D: Kontaktzone Knochen Metall

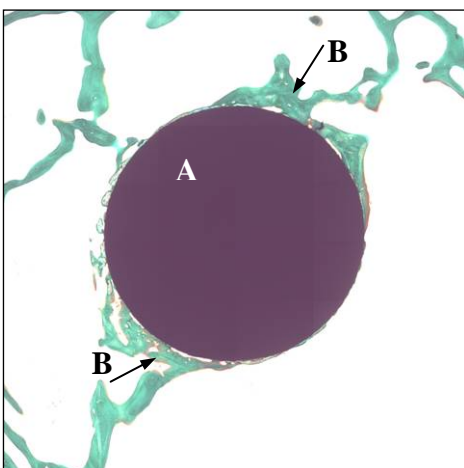


Abb. 19: Präparat mit GB14 Beschichtung 24 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel

A: Implantat, B: Knochentrabekel mit Anschluss an die Peripherie

4.2.2 Implantate mit 602020 Beschichtung

4.2.2.1 Implantationsdauer 2 Wochen

Starke zelluläre Reaktionen kennzeichnen das histologische Bild. Lösungsprozesse der Keramik führen zu Substanzdefekten, die mit Bindegewebszellen (Fibrozyten/ Fibroblasten) aufgefüllt werden (Abb. 21).

Auffällig ist eine massive Osteoidproliferation im Zuge der Knochenneubildung. Osteoidsäume mit zahlreichen aufsitzenden großen aktiven Osteoblasten (Abb. 20 und 22) charakterisieren die neu gebildeten Knochen trabekel, die lediglich über unverkalkte Knochenmatrix Kontakt zur Beschichtung aufnehmen (Abb. 20, 21, 22). Im *Interface* befinden sich, neben Osteoid, Bindegewebe mit Anschluss an neu gebildeten Knochen bzw. granulationsgewebeartige Formationen ohne Kontakt zu Knochenbälkchen.

In der Randzone erscheint die Keramikbeschichtung durch Lösungsprozesse durchsichtig und aufgehellet (Abb. 22).

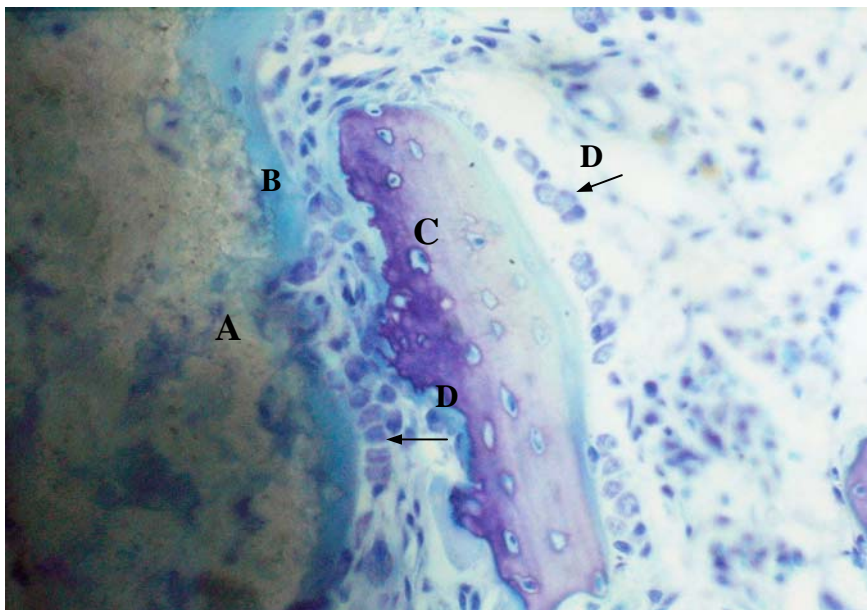


Abb. 20: Präparat mit 602020 Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Beschichtung, B: Osteoid, C: neu gebildeter Faserknochen,

D: aktive Osteoblasten

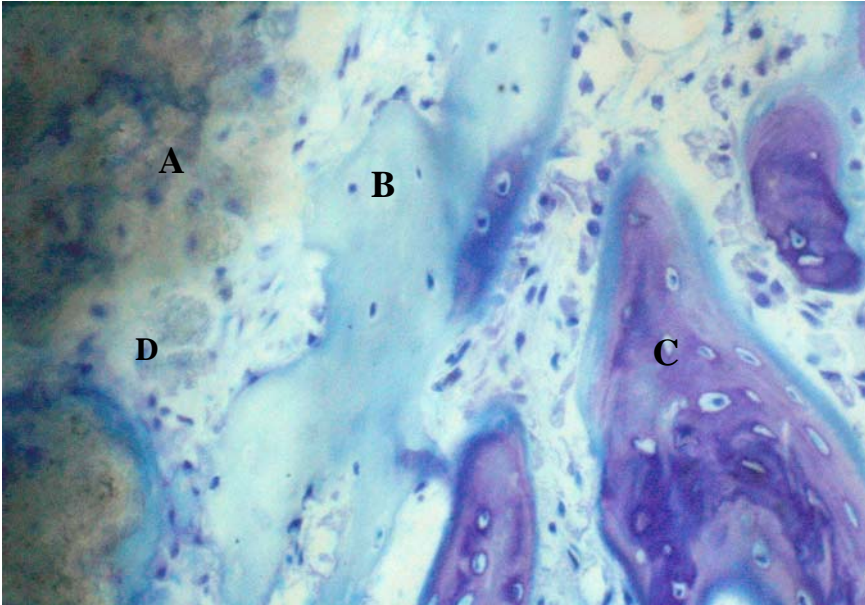


Abb. 21: Präparat mit 602020 Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Keramik, B: unverkalkte Knochenmatrix, C: Faserknochen,
D: Substanzdefekt der Keramik mit Fibrozyten

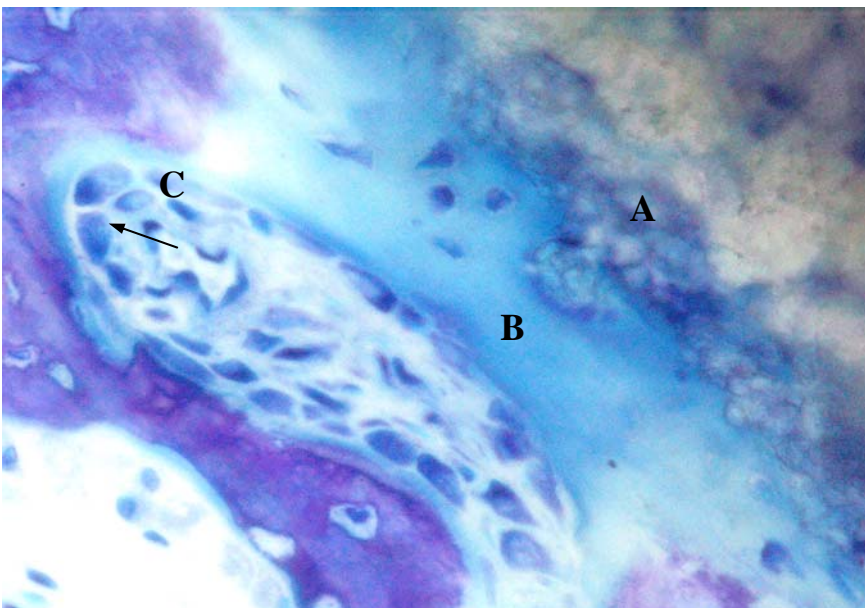


Abb. 22: Präparat mit 602020 Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:500,
A: Lösungszone der Beschichtung, B: unverkalkte Knochenmatrix,
C: aktive Osteoblasten

4.2.2.2 Implantationsdauer 4 Wochen

Innerhalb der Beschichtung finden fortgesetzt Resorptionvorgänge, gekennzeichnet durch löcherige Substanzverluste, statt.

Die Knochenbälkchen im Bereich des ehemaligen Bohrlochdefektes werden kompakter und konfluieren zum Teil (Abb. 23 und 24). Kontakt zur Beschichtung hat lediglich Osteoid (Abb.24). Mosaikstrukturen als Zeichen intensiver Umbauvorgänge sind in den Knochenbälkchen sichtbar (Abb. 23). Knochenreifung im Sinne von Entwicklung einer Lamellenstruktur findet statt.

Gleichzeitig besteht weiterhin ein breiter Osteoidsaum und aktive Osteoblasten sind zahlreich vorhanden (Abb. 25).

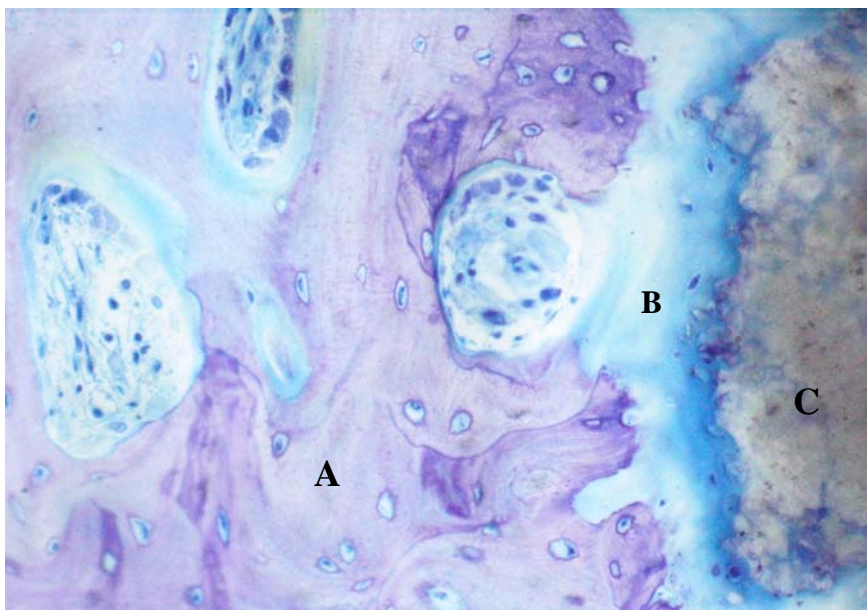


Abb. 23: Präparat mit 602020 Beschichtung 4 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Knochen mit Mosaikstrukturen, B: Osteoid, C: Keramik

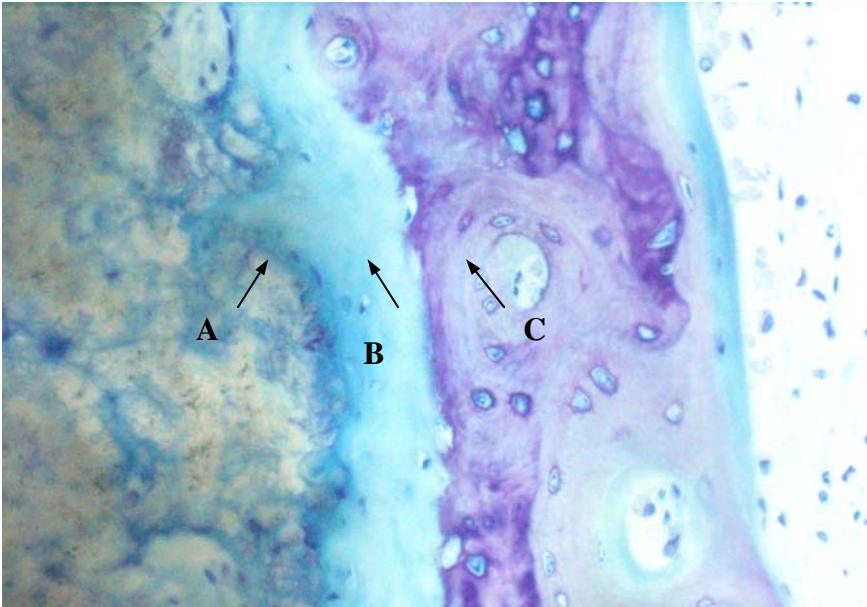


Abb. 24: Präparat mit 602020 Beschichtung 4 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
Grenzschicht zwischen Keramik/ Knochen:
A: Keramik, B: Osteoid, C: mineralisierter Knochen

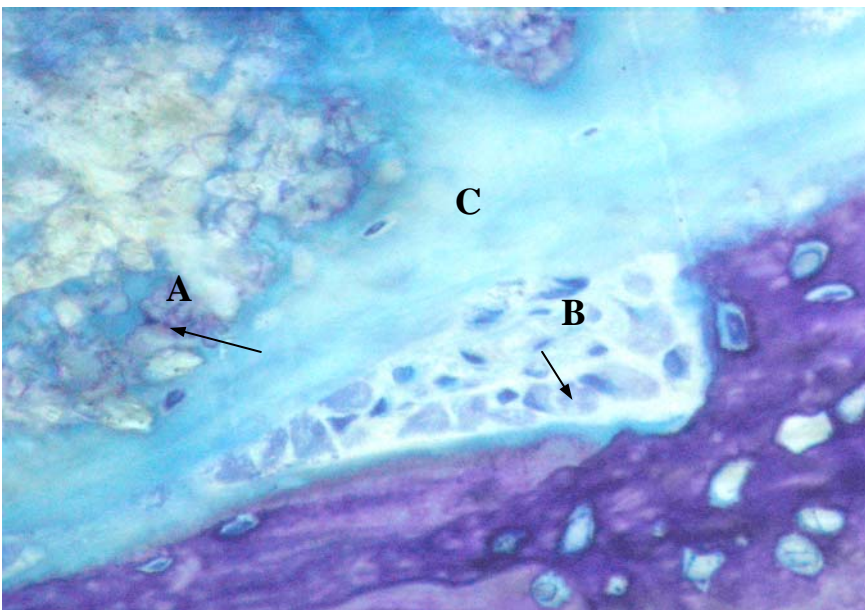


Abb. 25: Präparat mit 602020 Beschichtung 4 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:500,
A: Lösungszone der Beschichtung, B: aktive Osteoblasten, C: Osteoid

4.2.2.3 Implantationsdauer 6 Wochen

In der ehemaligen Defektzone hat sich aktives Knochenmark bzw. Fettmark entwickelt.

Um das Implantat wurde ein kompakter Knochenring ausgebildet (Abb. 26). Dieser besteht an der, der Beschichtung zugewandten, Seite aus Faserknochen, während zentrifugal der Knochen zu Lamellenknochen organisiert wird. Aktive Osteoblasten sind weiterhin vorhanden (Abb. 28).

Kontakt zum Implantat bzw. zur Beschichtung besteht über unverkalkte Knochenmatrix (Abb. 27 und 28); zu geringen Anteilen auch über Knochen.

An der 602020 Beschichtung laufen Resorptions- bzw. Lösungsvorgänge ab, die der Schicht eine zerklüftete Oberfläche verleihen (Abb. 27) und zu Diskontinuitäten führen, diese erreichen zum Teil den Metallkern des Implantats. Die Verbindung Metall Beschichtung bleibt dabei flächenhaft stabil erhalten.

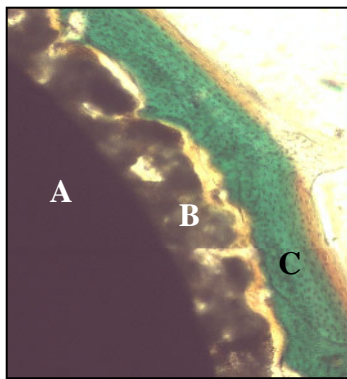


Abb. 26: Präparat mit 602020 Beschichtung 6 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Metall, **B:** Keramikbeschichtung, **C:** Knochenring

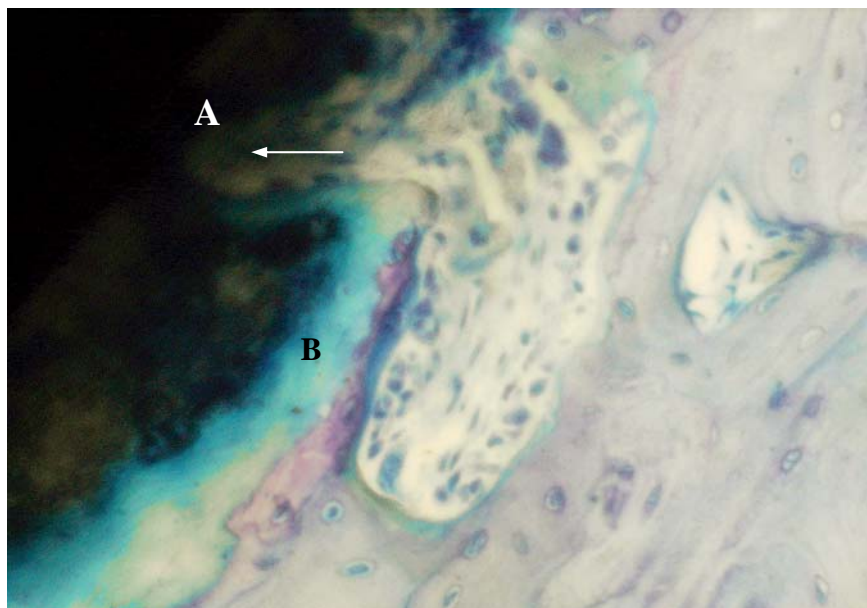


Abb. 27: Präparat mit 602020 Beschichtung 6 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Resorptionszone der Keramik, **B:** unverkalkte Knochenmatrix

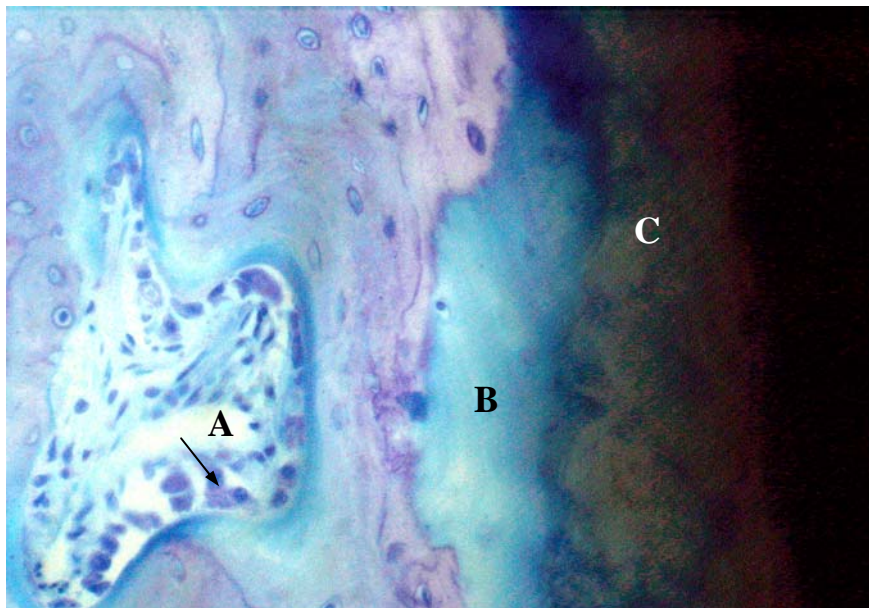


Abb. 28: Präparat mit 602020 Beschichtung 6 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Osteoblasten, B: Osteoid, C: Beschichtung

4.2.2.4 Implantationsdauer 12 Wochen

Der das Implantat umgebende Knochenring erscheint im Vergleich zur sechsten Versuchswoche mächtiger (Abb. 29). Innerhalb dieser Knochenformation sind Resorptionslakunen zu sehen, diese beherbergen Osteoklasten sowie Osteoblasten und undifferenzierte Bindegewebszellen in großer Zahl (Abb. 30, 31, 32).

Großräumige Substanzdefekte kennzeichnen die Struktur der Beschichtung. Die Löcher sind mit zahlreichen Fibroblasten ähnlichen Zellen oder mit wabig wolzig erscheinender unverkalkter Knochenmatrix gefüllt (Abb. 32). Mit dem Osteoid assoziiert sind aktive Osteoblasten vorhanden (Abb.32).

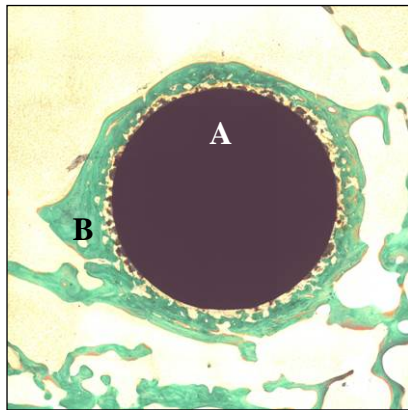


Abb. 29: Präparat mit 602020 Beschichtung 12 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** Knochenring

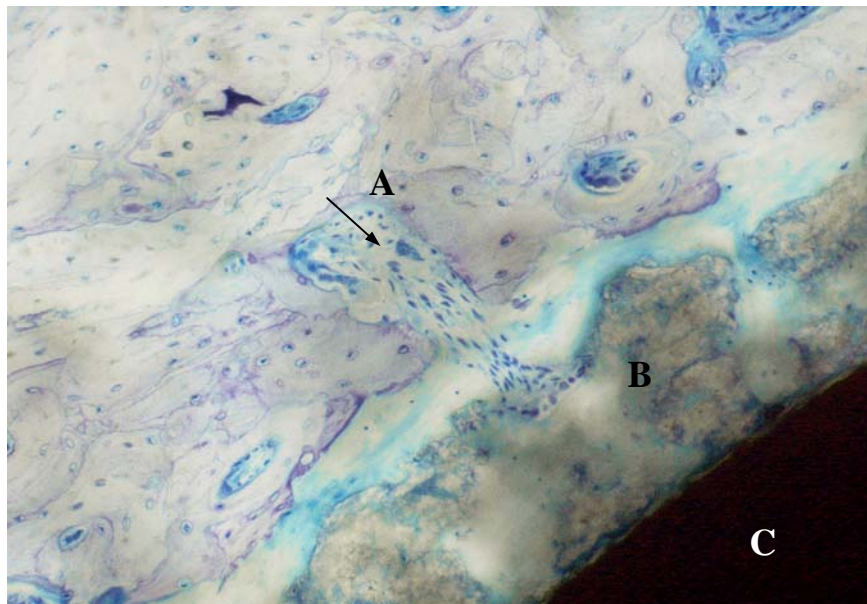


Abb. 30: Präparat mit 602020 Beschichtung 12 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:125,
A: Resorptionszone im Knochen auf die Beschichtung übergreifend,
B: Keramikbeschichtung, **C:** Metall

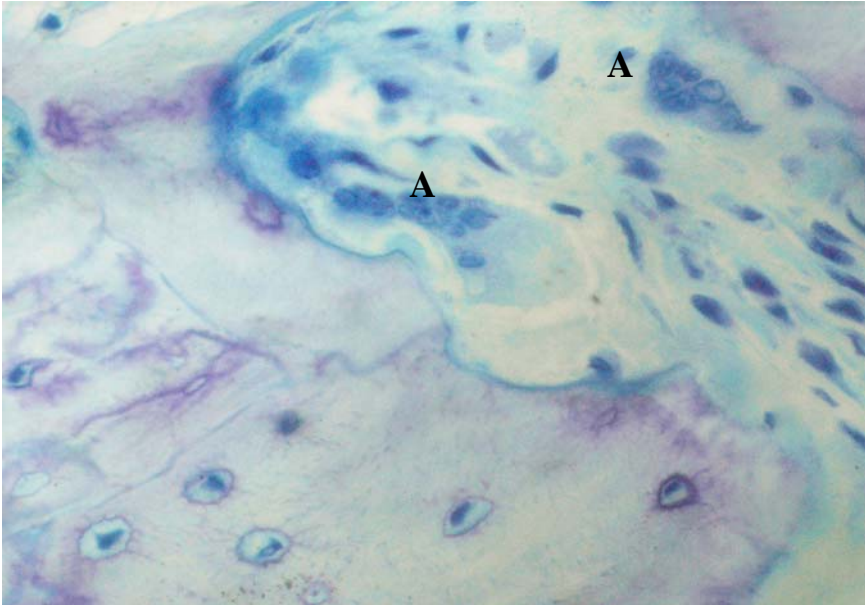


Abb. 31: Präparat mit 602020 Beschichtung 12 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:500,

A: Osteoklasten innerhalb der Resorptionszone von **Abb. 30**

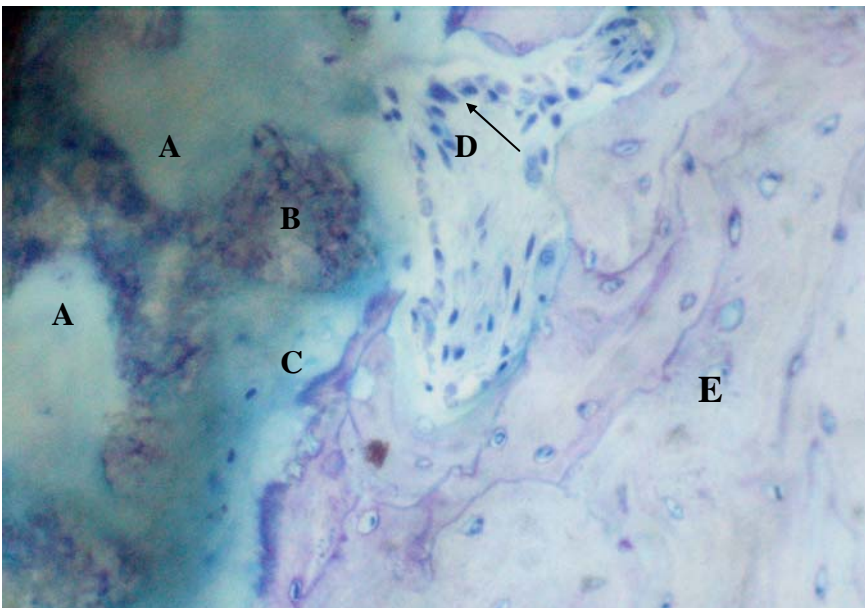


Abb. 32: Präparat mit 602020 Beschichtung 12 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Substanzdefekte innerhalb der Beschichtung, **B:** Keramik, **C:** Osteoid, **D:** Osteoblasten, **E:** Lamellenknochen

4.2.2.5 Implantationsdauer 24 Wochen

Resorptionszonen innerhalb des Knochenrings dehnen sich aus und nehmen untereinander Kontakt auf. Die ehemals kompakte durchgängig vorhandene Knochenlamelle um das Implantat herum verliert ihre Kontinuität (Abb.33). Mosaikstrukturen deuten auf ein fortgesetztes *Remodeling* hin (Abb. 33). Größere Knochenbälkchen fußen nun direkt auf dem Metall und bilden mit ihm einen direkten Verbund (Abb. 34).

In einzelnen Bereichen sind noch Reste der Beschichtung vorhanden, diese sind durch eine Schicht unverkalkten Gewebes mit dem Knochen verbunden (Abb. 33).

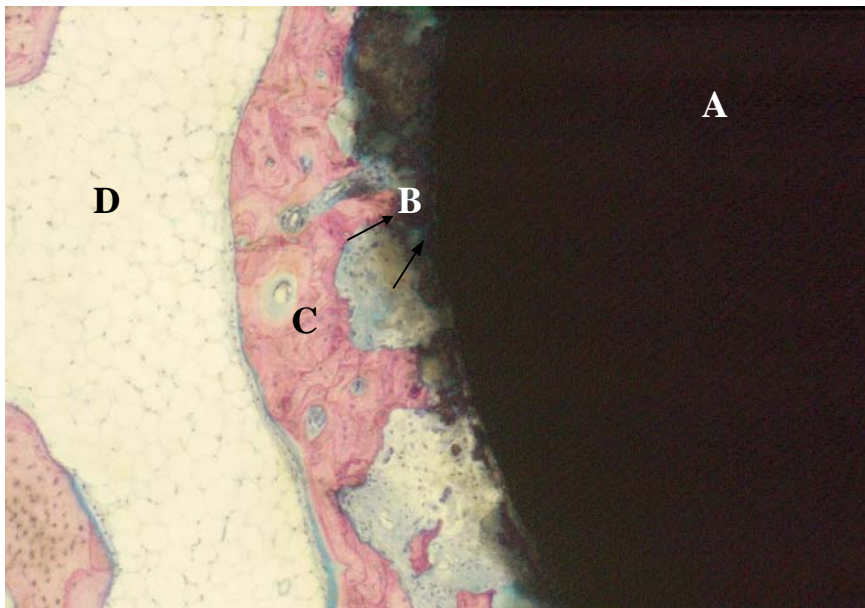


Abb. 33: Präparat mit 602020 Beschichtung 24 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:125,
A: Metall, B: Keramik(-reste), C: Knochenring, D: Fettmark

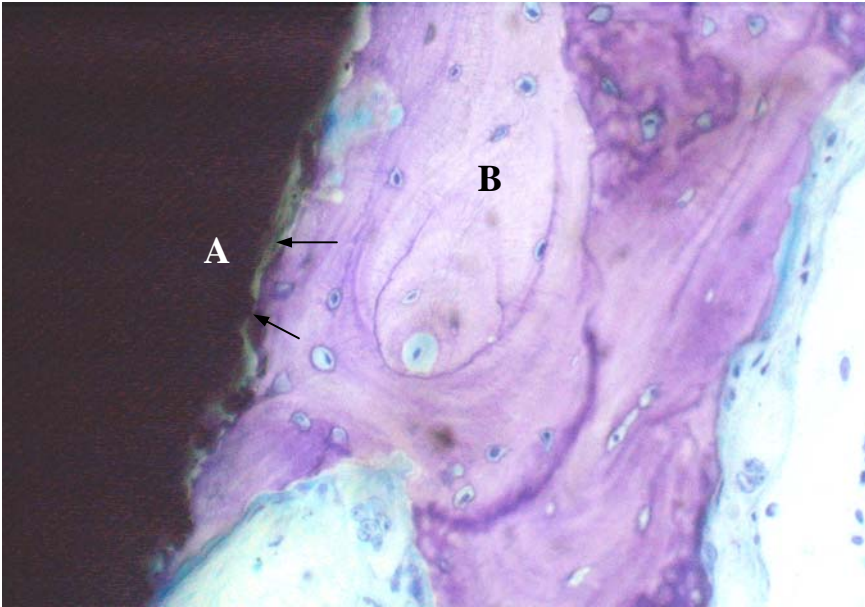


Abb. 34: Präparat mit 602020 Beschichtung 24 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Kontaktzone Knochen/Metall, **B:** Lamellenknochen

4.2.3 Implantate mit FA-CZP Beschichtung

4.2.3.1 Implantationsdauer 2 Wochen

Knochenneubildung im Bereich des Bohrlochdefekts findet in einer schmalen Zone um das Implantat herum vom Wirtsknochen ausgehend statt (Abb. 35). (Bei Präparaten aller anderen Beschichtungen ist ein größerer Anteil des Querschnitts in diesen Prozess involviert.)

Die aus Faserknochen bestehenden Knochenbälkchen zeichnen sich durch einen schmalen Osteoidsaum mit darauf aufgelagerten aktiven Osteoblasten aus (Abb. 36). Neu gebildete Knochenbälkchen sind relativ streng tangential um das Implantat herum ausgerichtet.

Das *Interface* ist angefüllt mit schwach gefärbter amorpher Grundsubstanz, die Fibroblasten ähnliche Zellen enthält (Abb. 36).

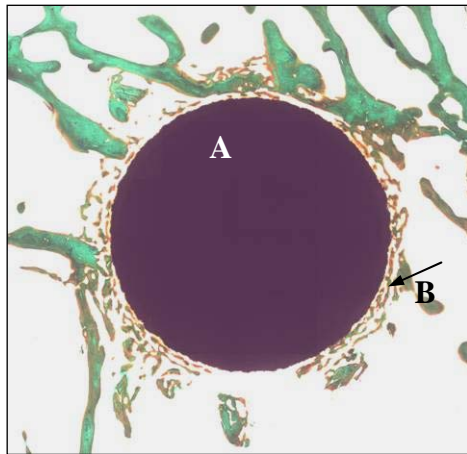


Abb. 35: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 2 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** Zone der Knochenneubildung

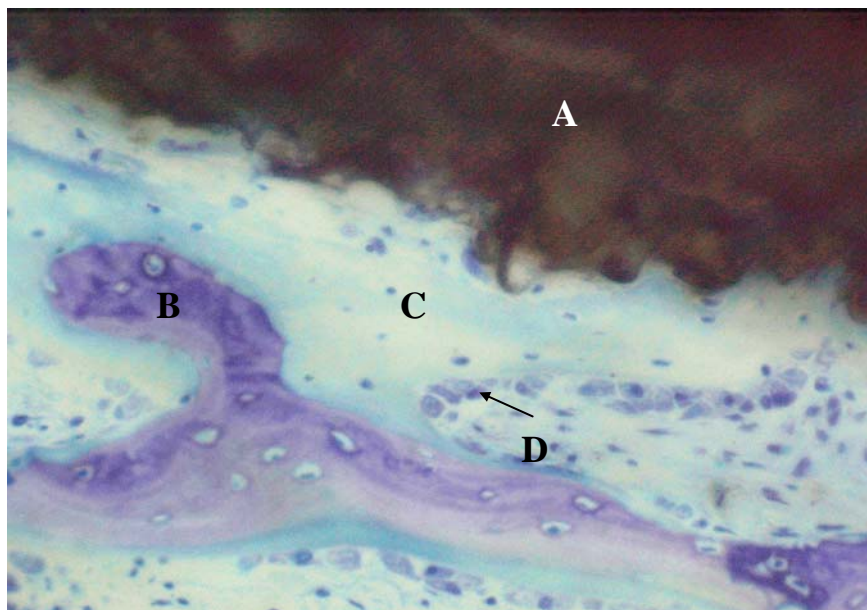


Abb. 36: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Beschichtung, **B:** neu gebildeter Faserknochen,
C: unverkalkte Knochenmatrix, **D:** Osteoblasten

4.2.3.2 Implantationsdauer 4 Wochen

Im Bereich des ehemaligen Bohrlochdefekts ist aktives Knochenmark bzw. Fettmark nachweisbar.

Die reparativ entstandenen Knochenbälkchen lassen eine gerichtete Faserstruktur im Sinne einer beginnenden Organisation zu Lamellenknochen erkennen (Abb. 37 und 38).

Osteoblasten auf den Osteoidsäumen der Trabekel sind noch vereinzelt zu sehen. Sie haben eine abgeflachte Form angenommen.

Im *Interface* differenziert sich neben Osteoid Bindegewebe mit Fibrozyten und Fasern (Abb. 37 und 38).

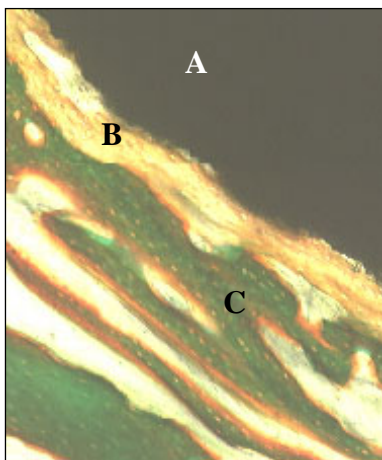


Abb. 37: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 4 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** Interface mit unverkalkten Strukturen, **C:** mineralisierter Knochen

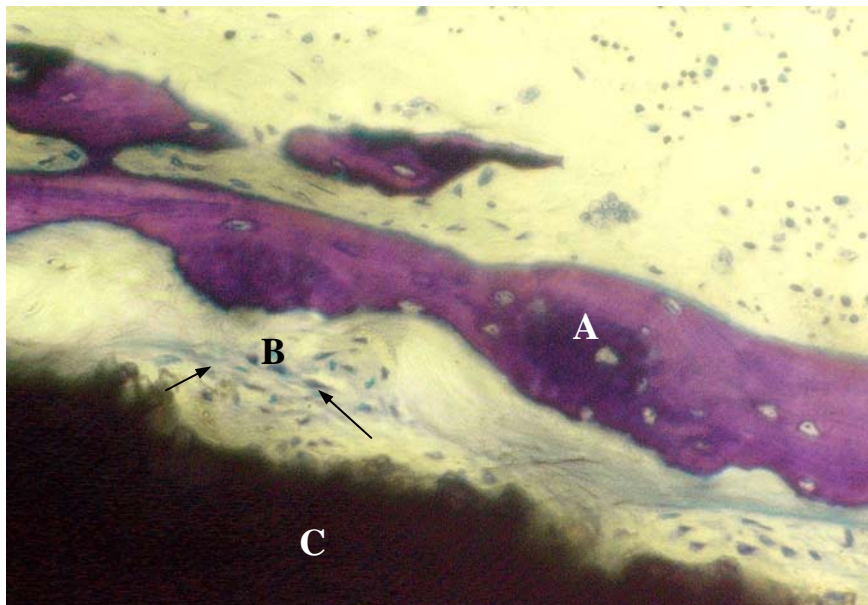


Abb. 38: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 4 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Knochen, **B:** kollagene Strukturen im *Interface*, **C:** Beschichtung

4.2.3.3 Implantationsdauer 6 Wochen

Ein schmaler diskontinuierlicher Knochenring formiert sich rings um das Implantat. Der Bereich des neu gebildeten Knochens zeigt Mosaikstrukturen, die als Zeichen fortdauernder Umbauprozesse zu werten sind (Abb. 39). Osteozyten dieser Zone erscheinen rundlich blasig (Abb. 40).

Im *Interface* bestehen die Formationen von Osteoid und kollagenem Bindegewebes fort (Abb.39 und 40).

Von der Beschichtung werden Partikel in die Umgebung entlassen (Abb. 39). Diese finden sich zum einen im Gewebe liegend und zum anderen von mehrkernigen Riesenzellen phagozytiert, in deren Zellinnerem wieder.

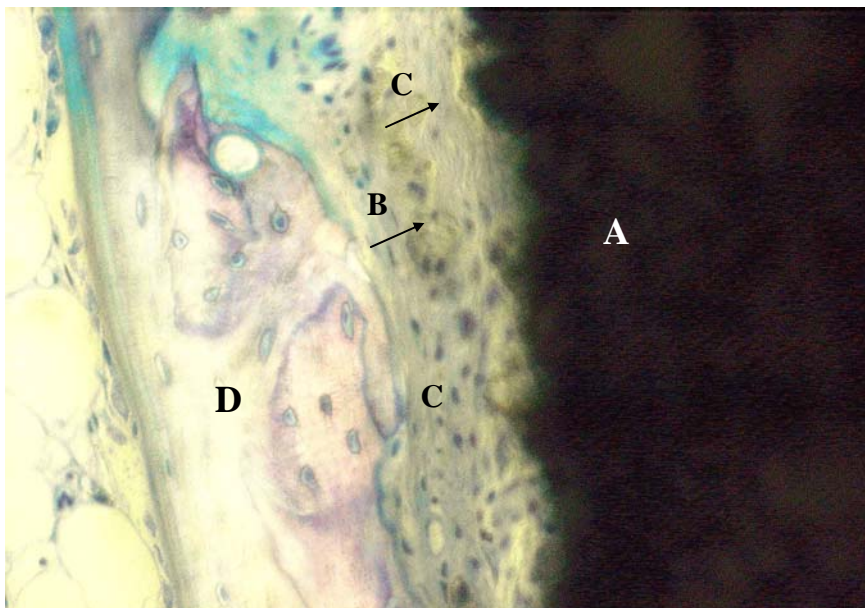


Abb. 39: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 6 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Beschichtung, B: Keramikpartikel,

C: kollagenes Gewebe im *Interface*, D: Knochen mit Mosaikmuster

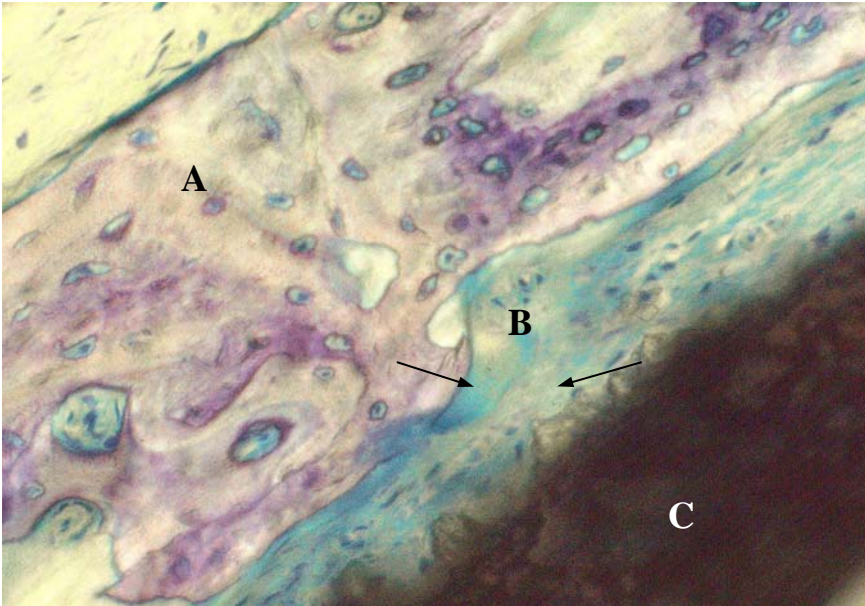


Abb. 40: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 6 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Knochen, **B:** *Interface* angefüllt mit unmineralisiertem Gewebe,

C: Beschichtung

4.2.3.4 Implantationsdauer 12 Wochen

Die ringförmige Knochenformation hat im Vergleich zur 6. Versuchswoche deutlich an Größe zugelegt. Das Knochengewebe dieses Bereichs reift zwar (Abb. 41), doch erscheinen die Osteozytenhöhlen blasig aufgetrieben und zum Teil leer (Abb. 42).

Innerhalb der Kontaktzone zur FA-CZP Beschichtung ist keine Tendenz zur Kalzifizierung erkennbar (Abb. 41).

Aus der Beschichtung stammende Keramikpartikel (Abb. 41) bilden eine graue Korona im *Interface*.

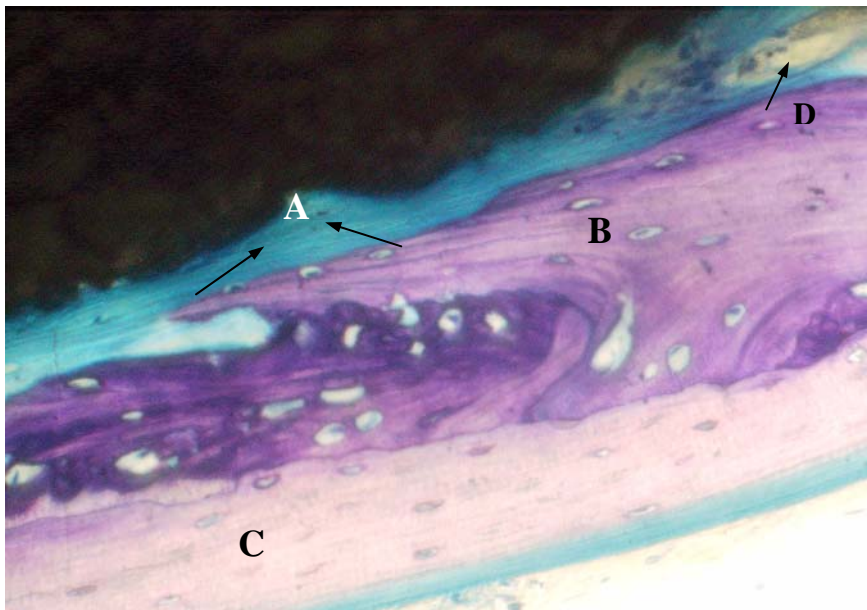


Abb. 41: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 12 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Kontaktzone zur Beschichtung nicht mineralisiert, B: reparativ entstandener Lamellenknochen, C: Wirtsknochen, D: Keramikpartikel

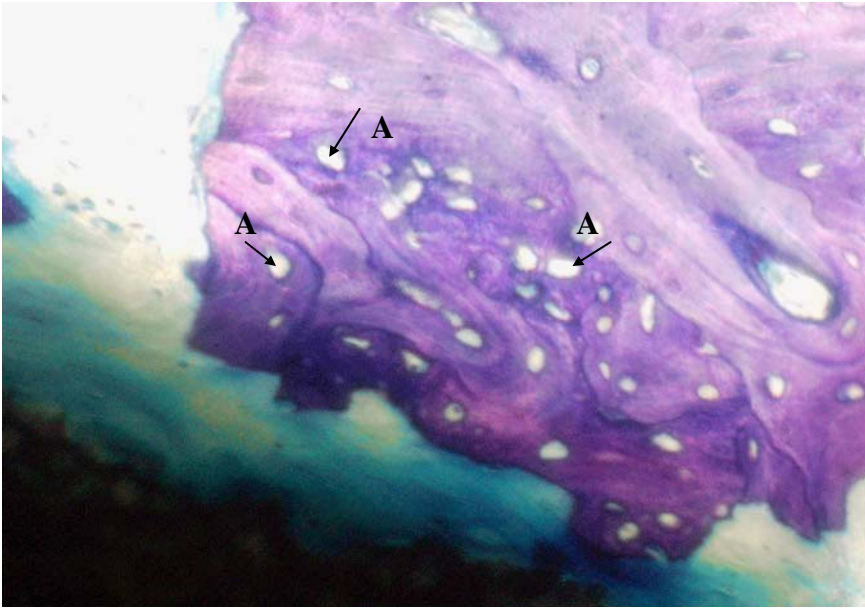


Abb. 42: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 12 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250, A: leere Osteozytenhöhlen

4.2.3.5 Implantationsdauer 24 Wochen

Am Versuchsende ist das Implantat fast vollständig von einem Knochenring bestehend aus Lamellenknochen umschlossen (Abb. 43). Dieser erhält vom Lager her Abstützung durch einzelne Knochenpfeiler (Abb. 43).

Das *Interface* ist fortgesetzt mit nicht kalzifiziertem Gewebe angefüllt, dessen Ausdehnung innerhalb des gesamten Versuchszeitraums tendenziell zuzunehmen scheint (Abb. 44).

Partikel streuen von der Oberfläche der Schicht ausgehend, in das Gewebe des *Interface* (Abb. 44 und 45). Kompakte Schichtablösungen vom Metallkern des Implantats kommen nicht vor.

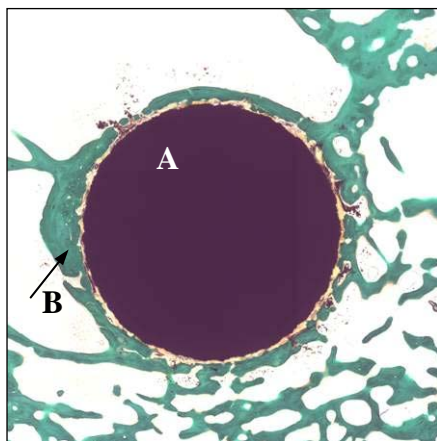


Abb. 43: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 24 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: Knochenring

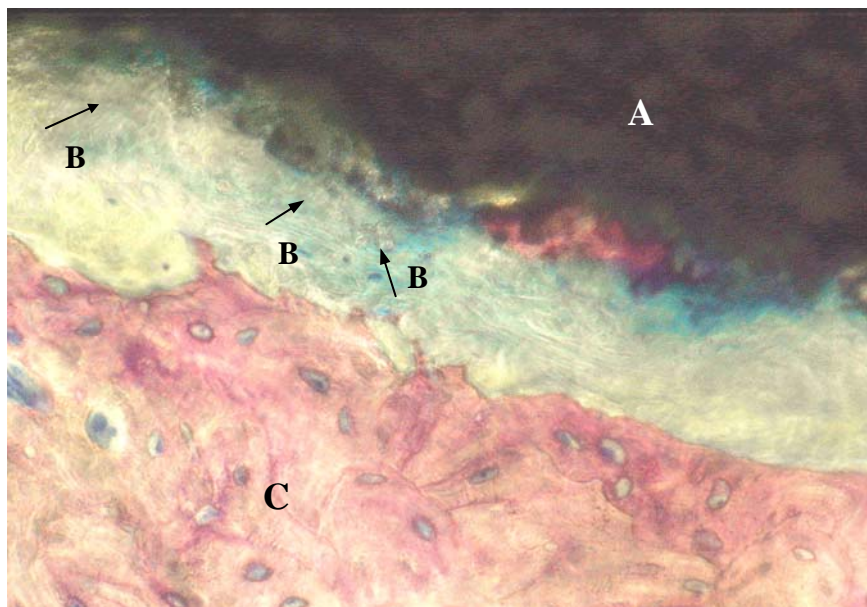


Abb. 44: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 24 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Beschichtung, B: Keramikpartikel im *Interface*, C: Knochen

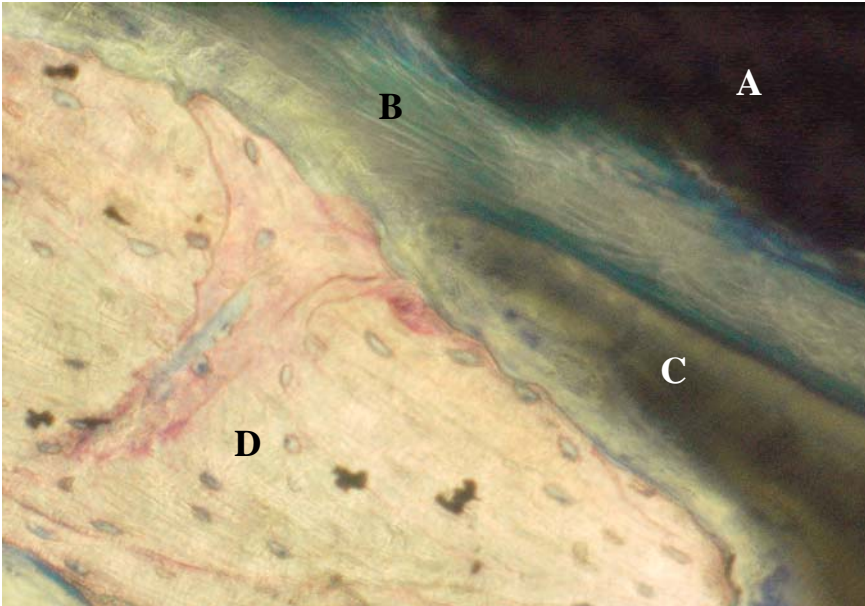


Abb. 45: Präparat mit FA-CZP Beschichtung 24 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Beschichtung, B: kollagene Strukturen im *Interface*,
C: Keramikpartikel aus der Beschichtung, D: Lamellenknochen

4.2.4 Implantate mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung

4.2.4.1 Implantationsdauer 2 Wochen

Vom Wirtsknochen ausgehend bildet sich ein feinmaschiges Netz neu gebildeter Knochentrabekel um das Implantat herum aus (Abb. 46). Diese Trabekel sind gekennzeichnet durch einen schmalen Osteoidsaum, dem wenige aktive Osteoblasten aufgelagert sind (Abb. 47).

Der Kontakt zur Implantatoberfläche wird über einen schmalen Saum unverkalkter Knochenmatrix aufgenommen.

Die Beschichtung lässt sich lichtmikroskopisch nicht nachweisen.

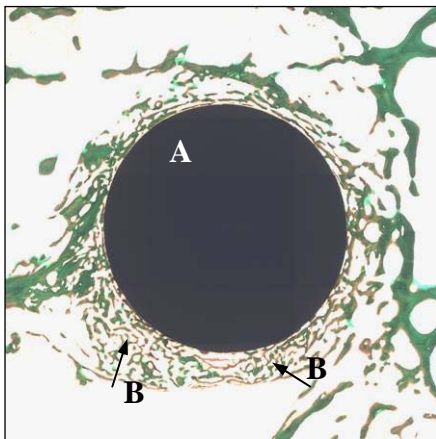


Abb. 46: Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 2 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel

A: Implantat, **B:** neu gebildeter Knochen

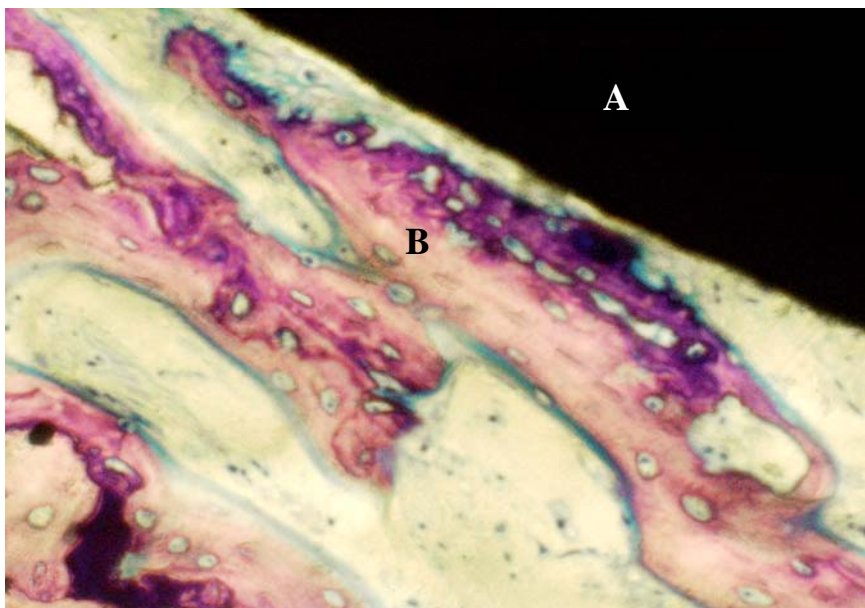


Abb. 47: Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 2 Wochen post impl., Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Metall, **B:** reparativ entstandener Faserknochen

4.2.4.2 Implantationsdauer 4 Wochen

Die neu gebildeten Knochenbälkchen erscheinen kompakter (Abb. 48), die Organisation zu Lamellenknochen beginnt (Abb. 49). Sie enthalten große runde Osteozyten (Abb. 49).

Auf der Implantatoberfläche nehmen sie über füßchenförmige Verbreiterungen Kontakt zum Implantat auf (Abb. 48). Dabei besteht innerhalb der Kontaktzone mineralisierter Knochen (Abb. 49).

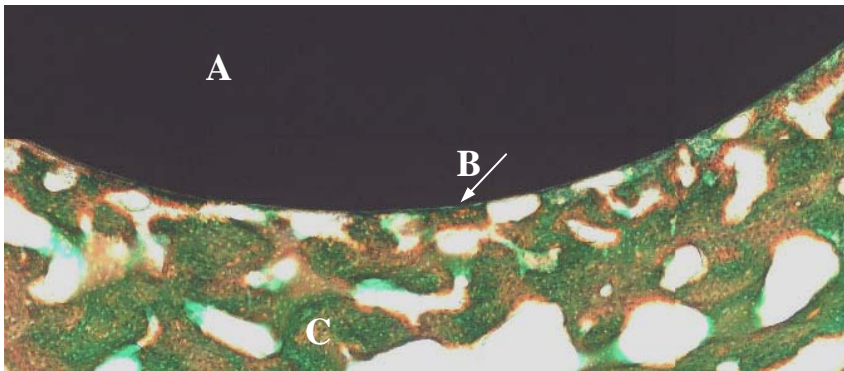


Abb. 48: Präparat mit Ca₄Ti₃O₁₀ Beschichtung 4 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel, **A:** Implantat, **B:** Kontaktzone Knochen Implantat, **C:** Knochen

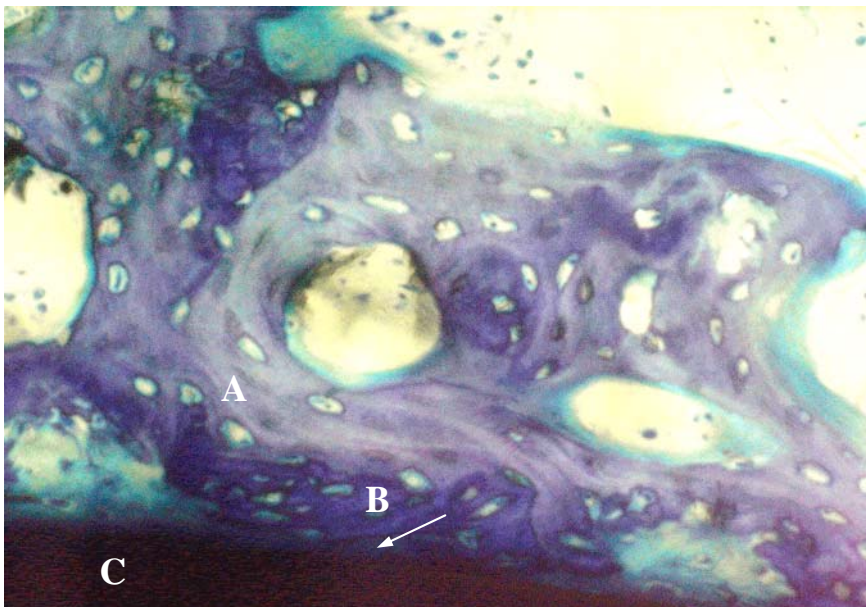


Abb. 49: Präparat mit Ca₄Ti₃O₁₀ Beschichtung 4 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250, **A:** Knochen, **B:** Kontaktzone des neu gebildeten Knochens zum Implantat, **C:** Metall

4.2.4.3 Implantationsdauer 6 Wochen

Knochenbälkchen umschließen das Implantat spangenartig (Abb. 50). Diese Knochenspangen liegen dabei dem Implantat nicht großflächig auf, sondern bilden pseudopodienartige Fortsätze aus, die in Kontakt mit der Beschichtung stehen (Abb. 50).

Mineralisierter Knochen nimmt ohne trennende Bindegewebsformationen Kontakt zur Implantatoberfläche auf (Abb. 51). Vom Lagerknochen ausgehend findet Organisation zu Lamellenknochen statt (Abb. 51).

In der Zone der reparativen Knochenneubildung befindet sich blutbildendes Knochenmark, bzw. Fettmark.

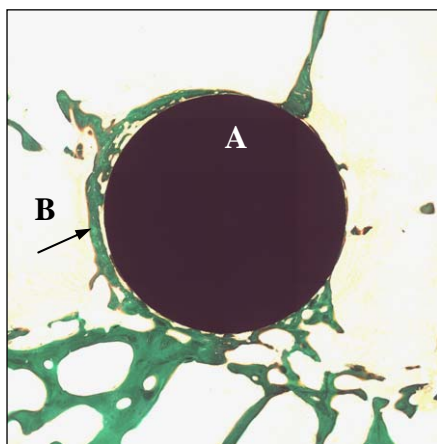


Abb. 50: Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 6 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: Knochenspange

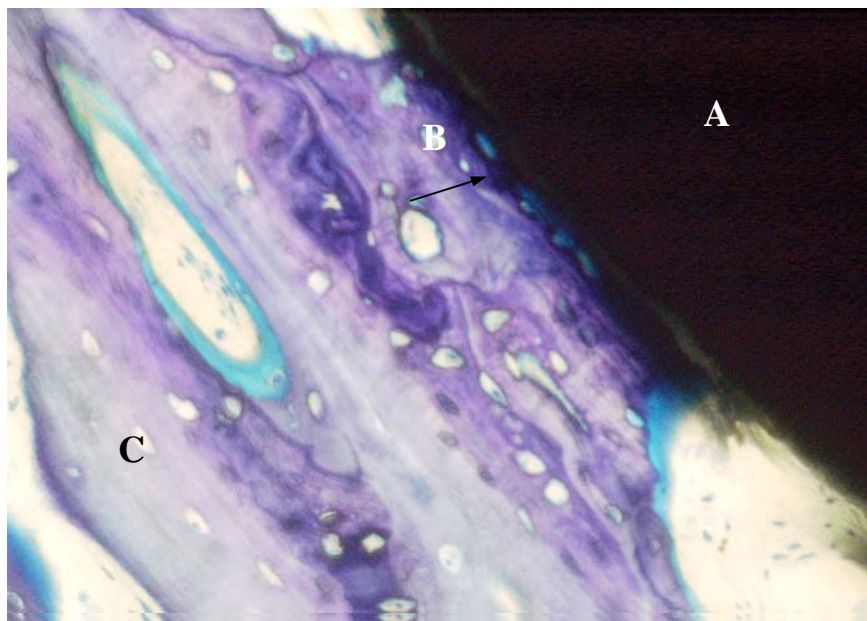


Abb. 51: Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 6 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Metall, B: Kontaktzone neu gebildeten Knochens zum Implantat, C: Lamellenknochen

4.2.4.4 Implantationsdauer 12 Wochen

Lamellenknochen umgibt das Implantat (Abb. 54). Im Vergleich zur 6. Versuchswoche erscheinen die Kontaktzonen zwischen Knochen und Implantat verbreitert (Abb. 54).

Innerhalb der Gruppe bestehen Unterschiede im histologischen Bild: Bei einem Teil der Proben bestehen fortgesetzt Knochenspangen, die das Implantat umschließen (Abb. 52). Beim anderen Teil ist die Spangenstruktur aufgelöst (Abb. 53).

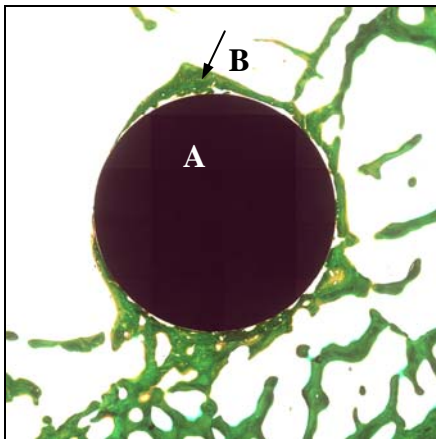


Abb. 52 Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 12 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: reifer Knochen

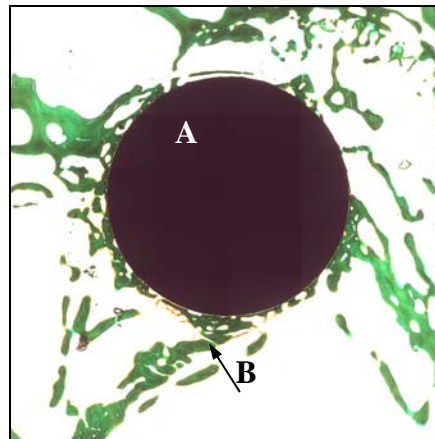


Abb. 53: Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 12 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner- Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: reifer Knochen

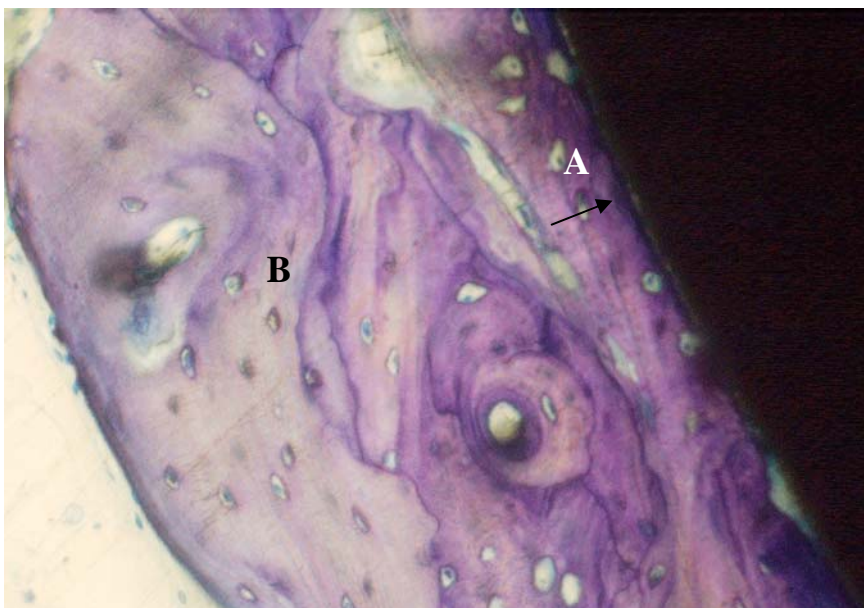


Abb. 54: Präparat mit $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung 12 Wochen post impl.
Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Kontaktzone Knochen/ Implantat, B: Lamellenknochen mit Mosaikmuster

4.2.4.5 Implantationsdauer 24 Wochen

Am Versuchsende erscheint das Implantat gut integriert in die reguläre Anordnung der vormalig vorhandenen Trabekelstruktur (Abb. 55).

Dabei ist im Vergleich zur 12. Versuchswoche eine Zunahme des Knochenvolumens (Abb. 55) und fortgesetztes *Remodeling* innerhalb des ehemaligen Bohrlochdefekts zu verzeichnen (Abb. 56).

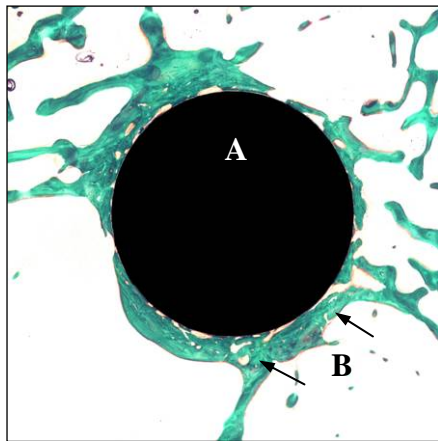


Abb. 55: Präparat mit Ca₄Ti₃O₁₀ Beschichtung 24 Wochen post impl., Masson-Trichrom-Goldner-Färbung, Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** Knochentrabekel mit Anschluss an die Peripherie

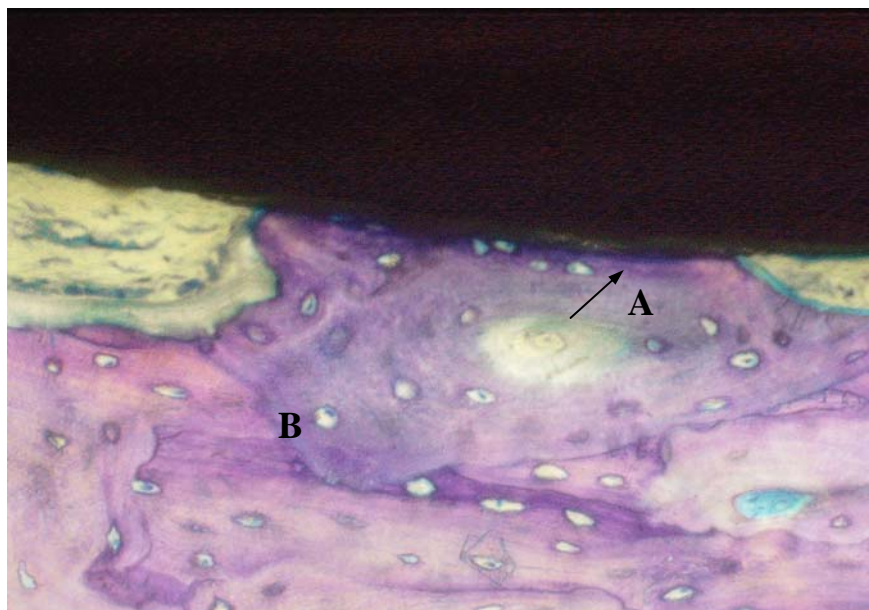


Abb. 56: Präparat mit Ca₄Ti₃O₁₀ Beschichtung 24 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Kontaktzone Knochen/ Implantat, **B:** Lamellenknochen

4.2.5 Implantate mit Hydroxylapatitbeschichtung

Nach 2 Versuchswochen hat sich ein Netz aus Faserknochen innerhalb des Bohrlochdefekts gebildet (Abb. 60). Direkter Kontakt zwischen Keramik und neu gebildetem Knochen ohne trennende bindegewebige Grenzschicht besteht über den gesamten Versuchszeitraum hinweg (Abb. 57, 58, 59).

Die reparativ entstandenen Knochen trabekel werden mit zunehmender Liegezeit des Implantats kompakter und machen eine Differenzierung zu Lamellenknochen durch (Abb. 58 und 59, bzw. 61 und 62). Auffällig ist, dass der Knochenkontakt zum Implantat flächenmäßig kontinuierlich ab der 4. Versuchswoche abzunehmen scheint.

In der 24. Versuchswoche erscheint das Implantat in die Tabekelstruktur des Lagerknochens integriert (Abb. 62). Es wird von einzelnen Knochenbälkchen zur Peripherie hin abgestützt. Hinweise für anhaltendes *Remodeling* sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

Der Verbund zwischen Metall und HA Beschichtung bleibt bei den meisten Präparaten stabil. In einigen Fällen traten flächenhaft Abplatzungen auf, die aber auch im Verlauf der Probenaufarbeitung entstanden sein können. Resorptionserscheinungen innerhalb der Beschichtung konnten nicht beobachtet werden.

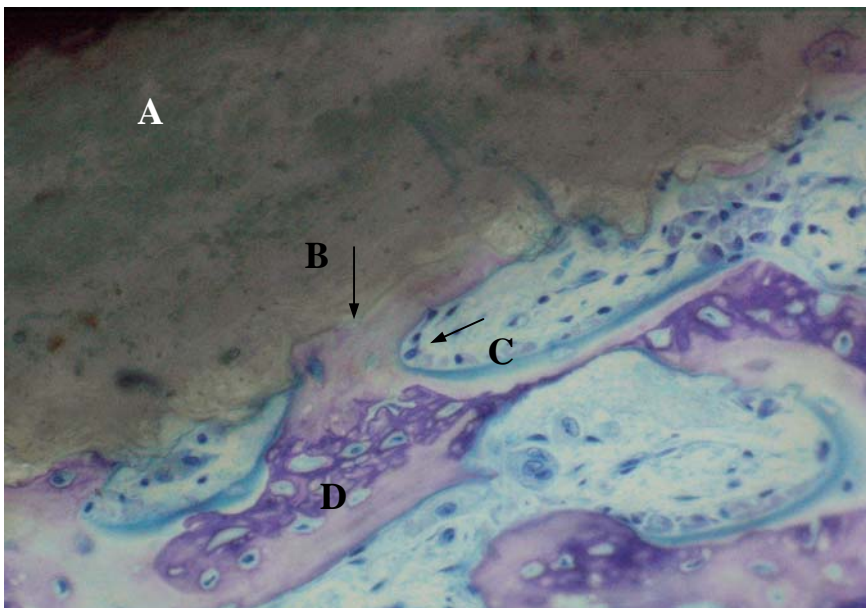


Abb. 57: Präparat mit HA Beschichtung 2 Wochen post impl. Giemsa- Färbung, Vergrößerung 1:250,

A: Beschichtung, B: Kontaktzone Keramik/Knochen,

C: aktive Osteoblasten, D: reparativ entstandener Faserknochen

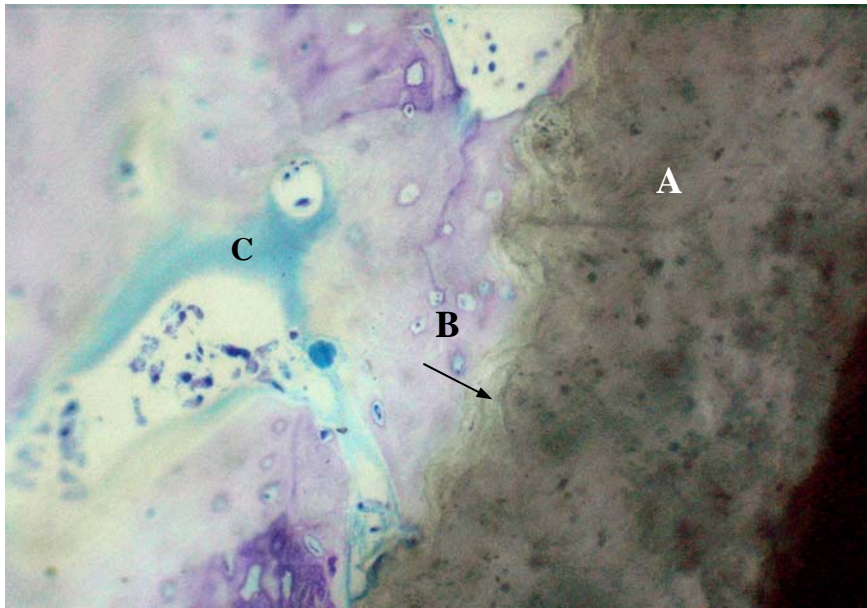


Abb. 58: Präparat mit HA Beschichtung 4 Wochen post impl. Giemsa- Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Beschichtung, **B:** Kontaktzone Keramik/Knochen, **C:** Osteoid

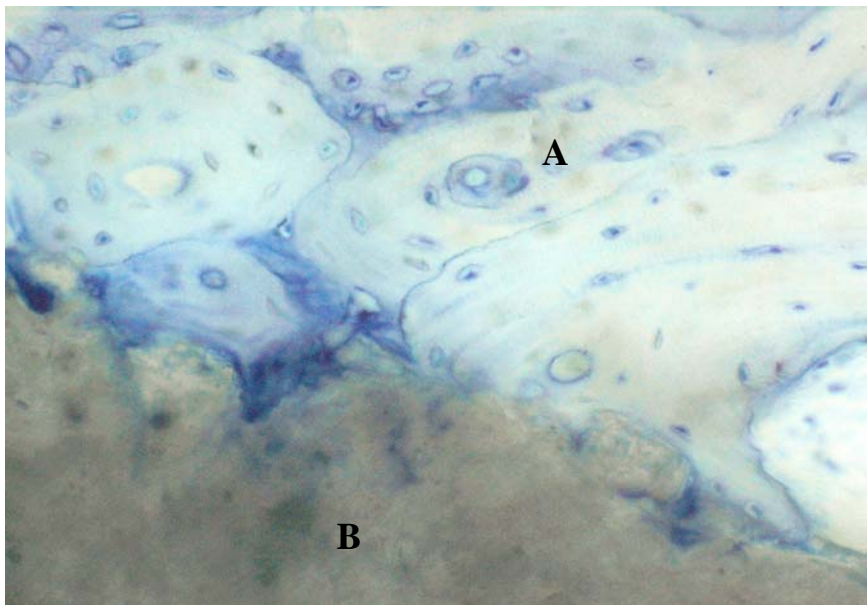


Abb. 59: Präparat mit HA Beschichtung 24 Wochen post impl. Giemsa- Färbung, Vergrößerung 1:250,
A: Lamellenknochen, **B:** Keramik

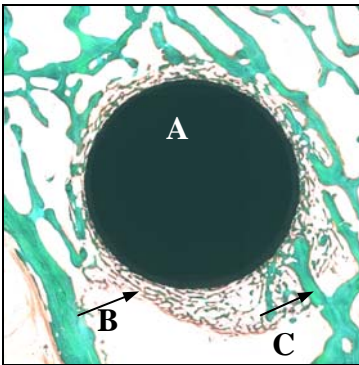


Abb. 60: Präparat mit HA Beschichtung 2 Wochen post impl.,
Masson-Trichrom-Goldner-Färbung,
Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: neu gebildeter Faserknochen, C: Wirtsknochen

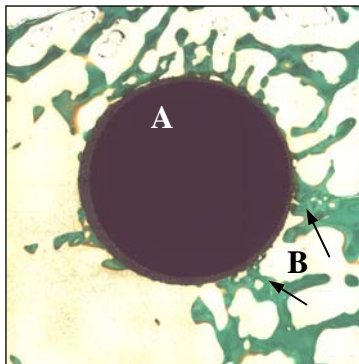


Abb. 61: Präparat mit HA Beschichtung 12 Wochen post impl.,
Masson-Trichrom-Goldner-Färbung,
Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: Knochentrabekel (reifer Knochen)

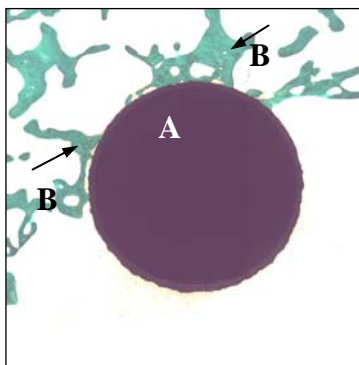


Abb. 62: Präparate mit HA Beschichtung 24 Wochen
post impl., Masson-Trichrom-Goldner-Färbung,
Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, B: Knochentrabekel (reifer Knochen)

4.2.6 Unbeschichtete Ti6Al4V Implantate

Die Defektzone um das Implantat wird innerhalb von 2 Wochen durch feintrabekuläre Strukturen aus Faserknochen ausgefüllt, von denen aus Kontakt mit der Oberfläche des Implantats aufgenommen wird (Abb. 63 und 66). Dabei befindet sich zunächst Osteoid in direktem Kontakt zur Titanlegierung (Abb. 64). Daneben ist auch Bindegewebe im *Interface* vorhanden (Abb. 63).

Der Osteoidsaum, der sich implantatseitig auf den neu gebildeten Knochentrabekeln befindet, wird kontinuierlich durch mineralisierte Knochensubstanz ersetzt (Knochenkontakt wird mit der 6. Woche hergestellt, unverkalkte Matrix ist ab der 12 Versuchswoche nicht mehr im *Interface* nachweisbar). Auch die Bindegewebsstrukturen verschwinden. Gleichzeitig verbreitern sich die Kontaktzonen neu gebildeten Knochens zum Implantat; die Trabekel werden mit zunehmender Versuchsdauer mächtiger (Abb. 66, 67, 68) und gleichzeitig findet Umbau von Faserknochen in Lamellenknochen statt (Abb. 65). Vom Lagerknochen ausgehend bilden sich Knochenpfeiler, die sich zum Implantat hin verzweigen bzw. verbreitern und es so zur Umgebung hin stabilisieren (Abb. 68).

Insgesamt laufen Knochenneubildung und Knochenreifung regulär ab.

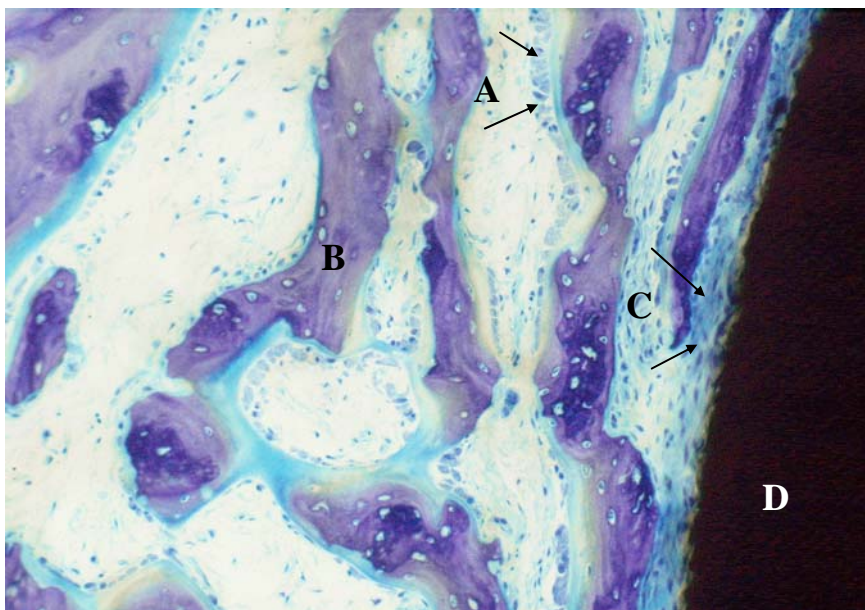


Abb. 63: Ti6Al4V Implantat 2 Wochen post impl. Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:125,

A: aktive Osteoblasten, **B:** neu gebildeter Faserknochen, **C:** Granulationsgewebe im *Interface*, **D:** Metall

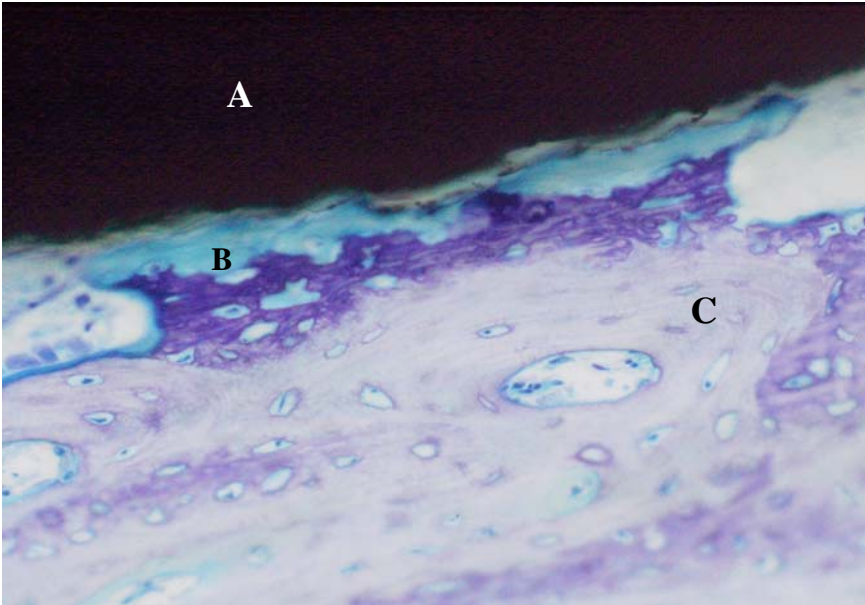


Abb. 64: Ti6Al4V Implantat 4 Wochen post impl., Giemsa-Färbung,
Vergrößerung 1:250,
A: Metall, B: Osteoid im *Interface*, C: neu gebildeter Knochen

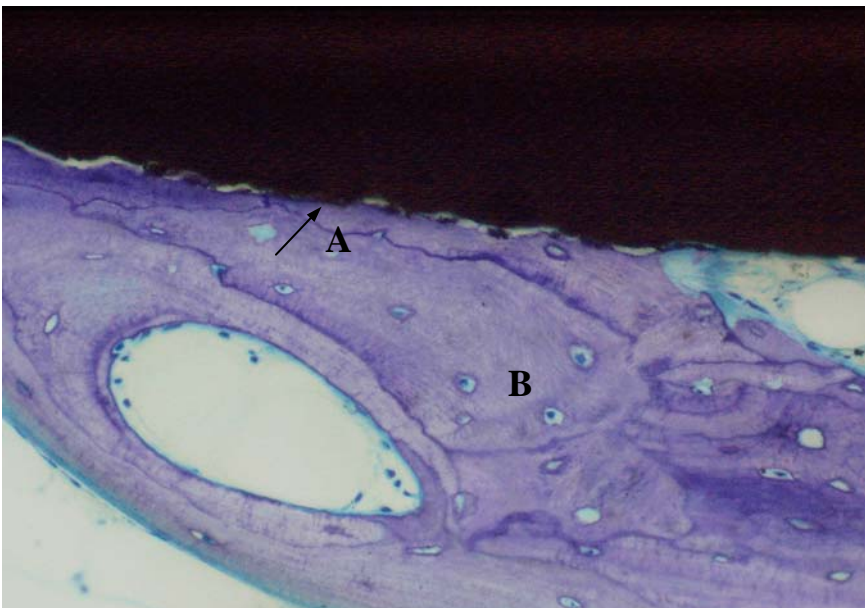


Abb. 65: Ti6Al4V Implantat 24 Wochen post impl., Giemsa-Färbung,
Vergrößerung 1:250,
A: Kontaktzone von Knochen und Implantat,
B: Lamellenknochen mit Mosaikstruktur

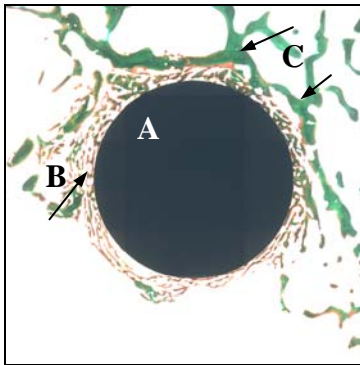


Abb. 66: Ti6Al4V Implantat 2 Wochen post impl.,
Masson-Trichrom-Goldner-Färbung,
Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** neu gebildeter Faserknochen,
C: Wirtsknochen

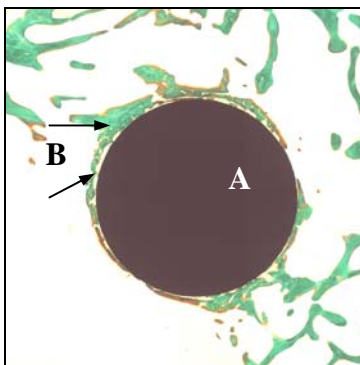


Abb. 67: Ti6Al4V Implantat 6 Wochen post impl., Masson-
Trichrom-Goldner-Färbung,
Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** reifender Knochen innerhalb der ehemaligen
Defektzone

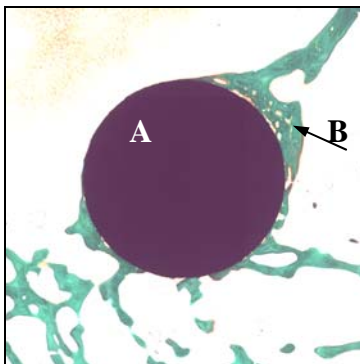


Abb. 68: Ti6Al4V Implantat 24 Wochen post impl.,
Masson-Trichrom-Goldner-Färbung,
Übersicht, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel
A: Implantat, **B:** Knochenpfeiler (reifer Knochen)

4.2.7 Zusammenfassung der histologischen Beurteilung der Schliffpräparate

In Tab. 12 sind die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Befundung histologischer Schliffpräparate der verschiedenen Implantattypen im zeitlichen Kontext zusammengefasst.

Tab. 12: Zusammenfassung und Vergleich der histologischen Befunde der einzelnen Implantattypen zu den jeweiligen Versuchszeiten

Versuchszeit	Implantate					
	GB14	602020	FA-CZP	Ca4Ti3O10	HA	Ti6Al4V
2 Wochen	Faserknochen mit aktiven Osteoblasten, Kontakt mineralisierter Knochen zur Beschichtung, Abplatzungen der Keramik vom Substrat	Faserknochen mit aktiven Osteoblasten, starke zelluläre Reaktionen, Kontakt von Osteoid zur Beschichtung, Lösungsprozesse der Keramikbeschichtung	Faserknochen mit wenigen aktiven Osteoblasten, Kontakt von Osteoid zur Beschichtung	Faserknochen mit wenigen aktiven Osteoblasten, Kontakt von Osteoid zum Implantat, (Beschichtung mikroskopisch nicht darstellbar)	Faserknochen mit aktiven Osteoblasten, Kontakt mineralisierter Knochen substanz zur Beschichtung	Faserknochen mit aktiven Osteoblasten, Kontakt von Osteoid zur Implantatoberfläche
4 Wochen	Beginn Knochenreifung, Kontakt mineralisierter Knochen zur Keramik, Resorption der Keramik	Beginn Knochenreifung, aktive Osteoblasten, Kontakt von Osteoid zur Beschichtung, Resorption der Keramik	Beginn Knochenreifung, Osteoid, bzw. Bindegewebe in Kontakt zur Keramik	Beginn Knochenreifung, Kontakt mineralisierter Knochen zum Implantat	Beginn Knochenreifung, Kontakt mineralisierter Knochen zur Beschichtung	Beginn Knochenreifung, Kontakt von Osteoid zum Implantat
6 Wochen	Umbau zu Lamellenknochen, Substanzdefekte der Keramik mit Knochengewebe ausgefüllt, Knochen in Kontakt zur Keramik	kompakter Knochenring um das Implantat, aktive Osteoblasten, Kontakt Osteoid zur Keramik	schmäler Knochenring um das Implantat, Osteoid und Bindegewebe im <i>Interface</i> , Freisetzung von Partikeln aus der Keramik	Umbau zu Lamellenknochen, Implantat wird spangenartig umschlossen, mineralisierter Knochen in Kontakt zum Implantat	Umbau zu Lamellenknochen, mineralisierter Knochen in Kontakt zur Keramik	Umbau zu Lamellenknochen, mineralisierter Knochen und teilweise Osteoid in Kontakt zum Metall
12 Wochen	Resorption der Keramik, Faserknochen an freigelegter Metalloberfläche, reifer Knochen in Kontakt mit der Keramik	kompakter Knochenring um das Implantat, Resorptionszonen in Keramik und Knochen, Kontakt Osteoid zur Keramik	kompakter Knochenring um das Implantat, ausbleibende Mineralisierung des Gewebes im <i>Interface</i> , Freisetzung von Partikeln aus der Keramik	reifer Knochen umgibt das Implantat, bindegewebsfreier Kontakt zur Oberfläche	reifer Knochen in Kontakt zur Keramik	reifer Knochen in Kontakt zur Implantatoberfläche
24 Wochen	Lamellenknochen in Kontakt zu Metallsubstrat, kompakte Keramikreste in Knochen trabekel eingeschlossen	Ringstruktur löst sich auf, Lamellenknochen in Kontakt zur Metalloberfläche, Reste von Keramik auf der Implantatoberfläche bleiben erhalten	kompakter Knochenring umschließt das Implantat, <i>Interface</i> angefüllt mit Bindegewebe u. Keramikpartikeln	Lamellenknochen in Kontakt zur Implantatoberfläche, Zunahme des Knochen volumens in der Defektzone	Lamellenknochen in Kontakt zur intakten Keramikbeschichtung	Lamellenknochen breitflächig in Kontakt zur Implantatoberfläche

4.3 Histomorphometrische Ergebnisse

Knochenneubildung und Osteointegration der Implantate werden für die einzelnen Versuchszeiträume hinsichtlich verschiedener Parameter quantitativ histomorphometrisch erfasst. In den folgenden Graphiken werden die Mittelwerte dieser Ergebnisse als kompakte Säulen mit der jeweiligen Standardabweichung (als senkrechte Linie darüber) dargestellt.

4.3.1 602020- und GB14 Beschichtungen im Vergleich zur HA Beschichtung

Die Beschichtungen 602020 und GB14 stellen Materialien ähnlicher chemischer Zusammensetzung dar. Die Keramiken weisen untereinander und insbesondere im Vergleich zur Kontrollgruppe mit HA-Beschichtung erhebliche Resorptionsunterschiede auf. Das erschwert einen direkten Vergleich zwischen den resorbierbaren Beschichtungen und der stabilen HA-Beschichtung, so dass es notwendig erschien bei 602020 und GB14 zusätzlich jeweils zwischen Kontaktfläche zur Beschichtung oder zum Metall des Grundkörpers zu unterscheiden. Außerdem wurde das kontaktierende Gewebe (Osteoid oder Knochen) differenziert (siehe 3.4.3 Histomorphometrie). Die Ergebnisse von GB14 und 602020 wurden statistisch verglichen.

4.3.1.1 Anteil mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes

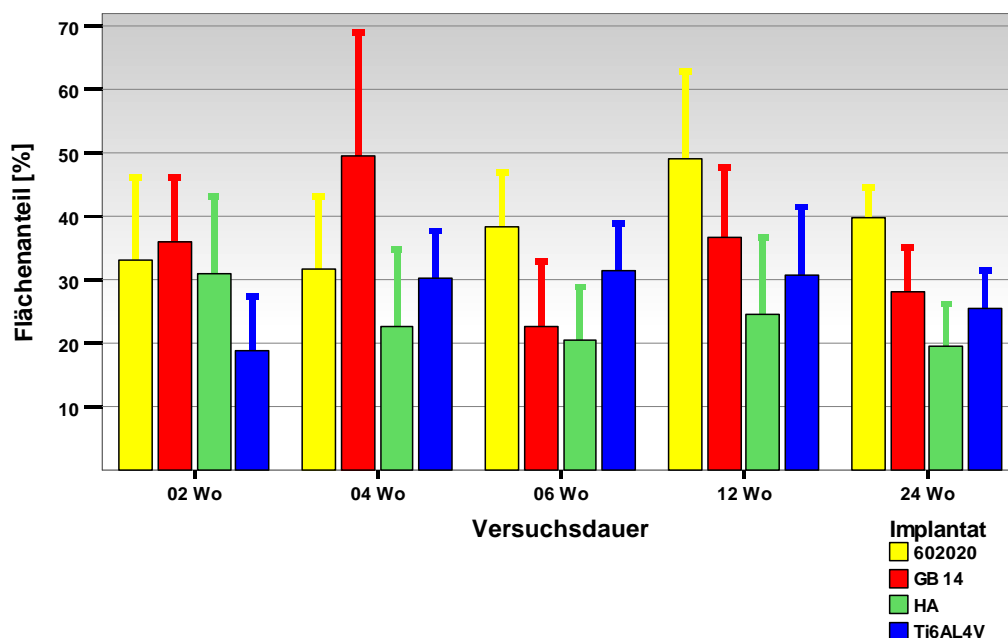


Abb. 69: Anteil mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes; Vergleich von 602020-, GB14-, HA- Keramik beschichteten und unbeschichteten Ti6Al4V- Implantaten; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Wie Abb. 69 zeigt, weisen Implantate, die mit Beschichtungen versehen sind (602020, GB14 und HA) zwei Wochen post operationem gegenüber der Titanlegierung eine höhere Knochenneubildungsrate auf. Die Dynamik der Knochenneubildung im zeitlichen Kontext unterscheidet sich im weiteren Versuchsverlauf bei den einzelnen Implantattypen. GB14 erreicht in der vierten Versuchswoche das Maximum, welches von 602020 erst in der 12. Woche post operationem erzielt wird (Abb. 69). Beide Maxima erreichen das gleiche Niveau (Tab. 13). Die Flächenanteile mineralisierten Knochens der resorbierbaren Substanzen unterscheiden sich mit Ausnahme der zweiten Versuchswoche wesentlich. Signifikante Unterschiede zwischen GB14 und 602020 hinsichtlich des Anteils mineralisierter Knochensubstanz sind in der 6. und 24. Versuchswoche nachweisbar (Tab. 13). Am Ende des Versuchs persistiert das Knochenvolumen bei 602020 im Vergleich zu HA und GB14 auf hohem Niveau (Abb. 69).

Tab. 13: Der Anteil mineralisierter Knochensubstanz innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten;
Mittelwerte und Standardabweichungen

<i>Versuchsdauer</i>	<i>602020</i>	<i>GB14</i>	<i>Signifikanz*</i>
2 Wochen	33,06 ± 13,77	35,99 ± 10,45	0,817
4 Wochen	31,67 ± 11,92	49,49 ± 20,52	0,059
6 Wochen	38,32 ± 8,99	22,80 ± 10,64	0,006
12 Wochen	49,19 ± 14,32	36,71 ± 11,48	0,083
24 Wochen	39,88 ± 4,94	28,25 ± 5,39	0,002

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.1.2 Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes

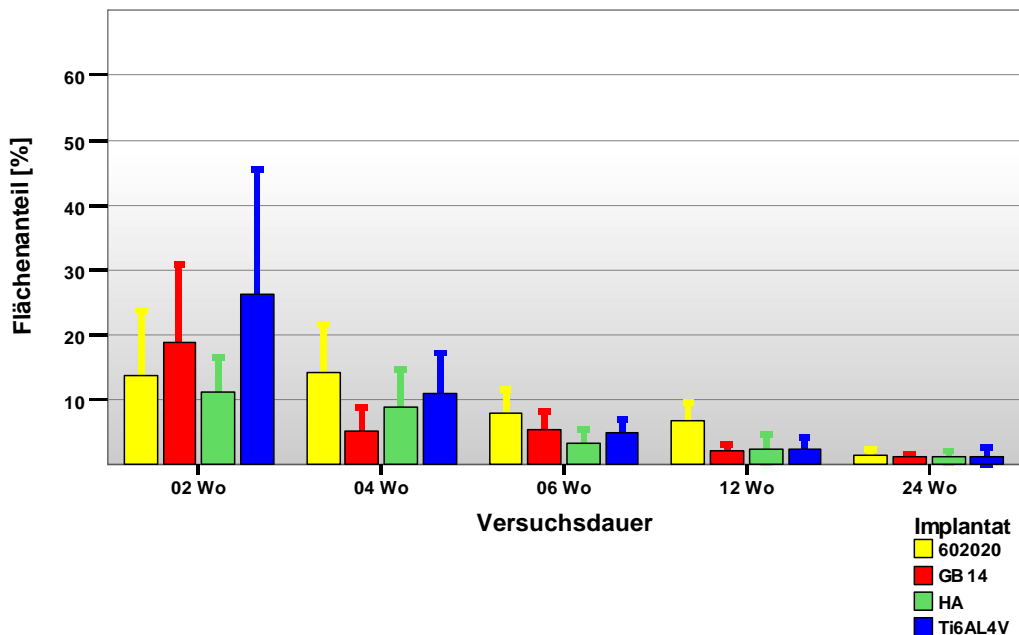


Abb. 70: Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes; Vergleich von 602020-, GB14-, HA- Keramik beschichteten und unbeschichteten Ti6Al4V- Implantaten; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Der Anteil Osteoid an mineralisiertem Knochen ist ein Indikator für den Mineralisierungsgrad des neu gebildeten Knochens, also für die Knochenreifung. Je höher der Anteil Osteoid, desto niedriger ist demnach der Mineralisierungsgrad des Knochens.

In der frühen Phase der Knochenheilung (zweite Versuchswoche) ist die Verkalkung der neu gebildeten Knochensubstanz noch unvollständig. Das wird durch hohe Osteoidanteile repräsentiert (Abb. 70). Die Titanlegierung erreicht dabei mit 26,29 % die höchsten Werte (Abb. 70). Bei GB14 und 602020 gibt es mit 13,84 % und 18,79 % im Mittel zu diesem Zeitpunkt noch keinen signifikanten Unterschied (Tab. 14). Während bei GB14 der Mineralisierungsgrad des neu gebildeten Knochens in der vierten Woche nach der Operation deutlich zugenommen hat, was sich durch eine deutliche Abnahme des Osteoidanteils bemerkbar macht, weist 602020 sogar noch eine geringfügige Steigerung des Flächenanteils von Osteoid auf (Abb. 70). Der Anteil Osteoid bleibt auch in der 12. Versuchswoche bei 602020 signifikant höher als innerhalb der GB14 Gruppe (Tab. 14). Am Versuchsende 24 Wochen post operationem gleichen sich die beiden Versuchsgruppen an (Tab. 14, Abb. 70).

Tab. 14: Der Anteil Osteoid an mineralisiertem Knochen innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

Versuchsdauer	602020	GB14	Signifikanz*
2 Wochen	13,84 ± 10,24	18,79 ± 11,32	0,298
4 Wochen	14,19 ± 7,19	5,27 ± 3,56	0,005
6 Wochen	7,98 ± 3,47	5,46 ± 1,80	0,115
12 Wochen	6,78 ± 2,37	2,08 ± 1,00	0,001
24 Wochen	1,47 ± 0,48	1,29 ± 0,27	0,636

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.1.3 Kontakt von Osteoid bzw. Knochen zur Beschichtung (in %)

Für die resorbierbaren Materialien wurde der Flächenanteil der Beschichtung bestimmt, der jeweils mit Osteoid bzw. Knochen bedeckt ist.

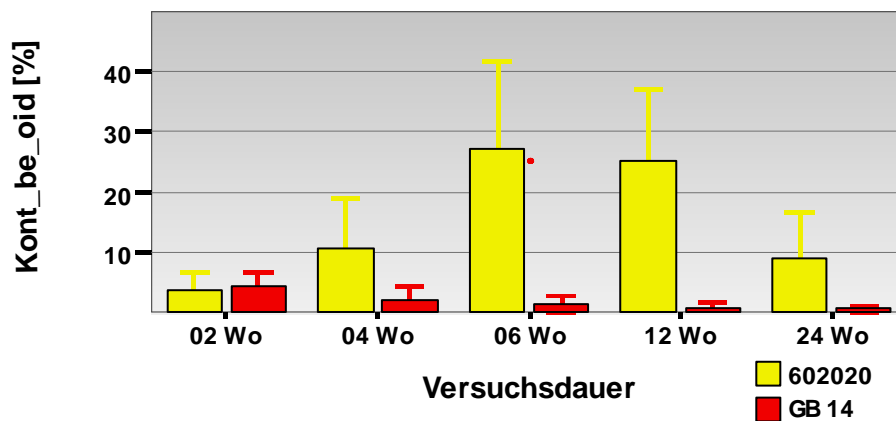


Abb. 71a: Anteil der Keramikoberfläche (in %), der von **Osteoid** bedeckt ist; Vergleich von Implantaten mit 602020- und GB14- Beschichtung; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

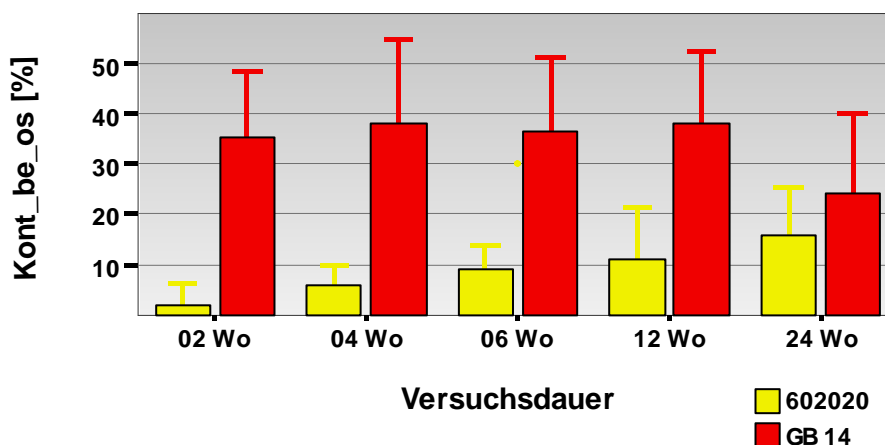


Abb. 71b: Anteil der Keramikoberfläche (in %), der von **Knochen** bedeckt ist; Vergleich von Implantaten mit 602020- und GB14- Beschichtung; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Bei den mit 602020 beschichteten Implantaten dominiert der Kontakt unverkalkter Knochenmatrix zur Keramik (Abb. 71a). In der sechsten Versuchswoche wird das Maximum (26,03%) erreicht und bis zur 12. Woche verbleibt der Wert auf hohem Niveau (Tab. 15). Bis zur 24. Woche post operationem ist ein deutliches Absinken (8,99%) zugunsten des Knochenkontakts (15,84%) zu verzeichnen (Tab. 15).

GB14 zeigt ein konträres Verhalten (Abb. 71a und 71b): der Kontakt von Osteoid zur Beschichtung erreicht mit 4,18% in der 2. Versuchswoche sein Maximum und nimmt kontinuierlich zum Versuchsende hin ab (0,54%). Die Werte liegen damit ab der vierten Versuchswoche hoch signifikant unter denen von 602020 (Tab. 15).

Gleichzeitig befinden sich bis zur 12. Woche post op. gegenüber 602020 signifikant höhere Anteile der Beschichtung in Kontakt zu mineralisiertem Knochen (Tab. 15). Wobei der Knochenkontakt bei GB14 beschichteten Implantaten bis dahin auf annähernd gleichem Niveau verbleibt und mit fortschreitender Resorption der Schicht zur 24. Versuchswoche hin abnimmt (Abb. 71b).

Tab. 15: Der Kontakt von Osteoid bzw. Knochen zur Beschichtung innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

	<i>Osteoid in %</i>			<i>Knochen in %</i>		
<i>Versuchs- dauer</i>	<i>602020</i>	<i>GB14</i>	<i>Signifikanz*</i>	<i>602020</i>	<i>GB14</i>	<i>Signifikanz*</i>
2 Wochen	3,69 ± 2,43	4,13 ± 2,29	0,728	2,07 ± 2,14	34,73 ± 13,12	0,001
4 Wochen	10,75 ± 6,35	2,16 ± 2,20	0,006	5,76 ± 3,77	37,86 ± 17,05	0,001
6 Wochen	27,03 ± 13,70	1,37 ± 0,69	0,001	9,10 ± 3,64	36,47 ± 14,77	0,002
12 Wochen	24,99 ± 5,52	0,80 ± 0,96	0,001	10,93 ± 8,97	38,04 ± 14,44	0,004
24 Wochen	8,99 ± 7,29	0,54 ± 0,24	0,009	15,84 ± 8,28	24,10 ± 12,45	0,172

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.1.4 Kontakt von Osteoid bzw. Knochen zum Metall (in %)

Es wurden die Anteile der freiliegenden Metalloberfläche der Implantate bestimmt, die sich nach Resorption der Beschichtung in Kontakt mit Osteoid bzw. Knochen befanden.

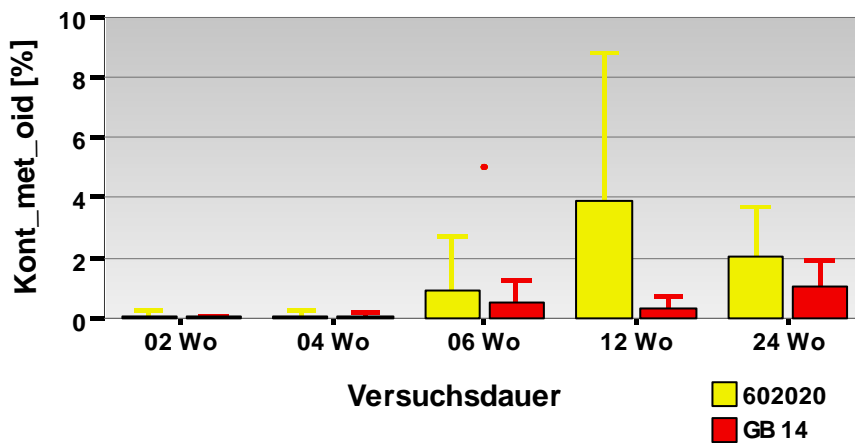


Abb. 72a: Anteil der Metalloberfläche bezogen auf den Implantatumfang (in %), der von **Osteoid** bedeckt ist; Vergleich von Implantaten mit 602020- und GB14- Beschichtung; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

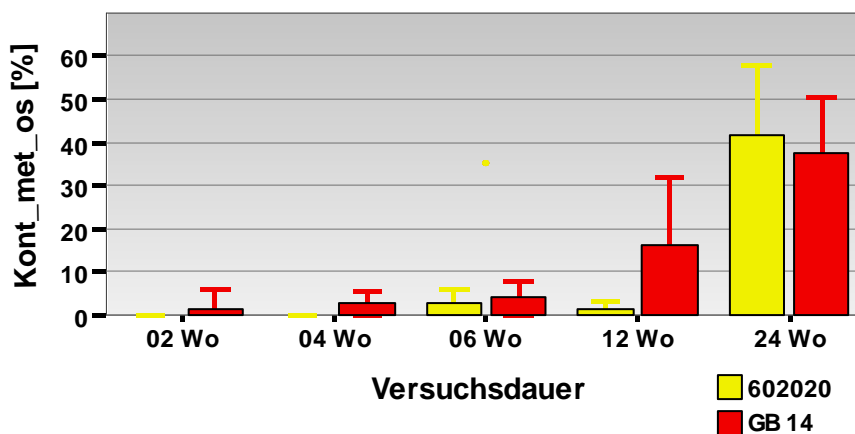


Abb. 72b: Anteil der Metalloberfläche bezogen auf den Implantatumfang (in %), der von **Knochen** bedeckt ist; Vergleich von Implantaten mit 602020- und GB14- Beschichtung; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Die Kontaktflächen zum Metall von Osteoid und Knochen zeigen im Vergleich zu den mit der Beschichtung ermittelten Daten weniger deutliche Unterschiede zwischen den beiden Implantattypen (Abb. 71a und 71b bzw. 72a und 72b).

Die Implantate aus der 602020 Gruppe weisen innerhalb 12. Versuchswoche signifikant mehr Kontaktfläche des Osteoids zum Metallsubstrat auf. Demgegenüber zeigt GB14 in den Versuchszeiträumen 4 Wochen und 12 Wochen signifikant mehr Knochenkontakt als 602020 (Tab. 16). Die Kontaktflächen beider Gewebeformen zur Titanlegierung haben entsprechend der Freisetzung dieser Oberfläche durch Resorption der Beschichtung eine steigende Tendenz (Abb. 72a und 72b).

Tab. 16: Der Kontakt von Osteoid, bzw. Knochen zum Metall innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

	<i>Osteoid in %</i>			<i>Knochen in %</i>		
<i>Versuchsdauer</i>	<i>602020</i>	<i>GB14</i>	<i>Signifikanz*</i>	<i>602020</i>	<i>GB14</i>	<i>Signifikanz*</i>
2 Wochen	0,04 ± 0,11	0,04 ± 0,06	0,458	0,00 ± 0,00	1,54 ± 3,73	0,082
4 Wochen	0,05 ± 0,13	0,08 ± 0,09	0,287	0,00 ± 0,00	2,74 ± 2,72	0,001
6 Wochen	0,93 ± 1,02	0,54 ± 0,62	0,746	2,76 ± 3,08	3,97 ± 4,01	0,492
12 Wochen	3,93 ± 4,03	0,35 ± 0,36	0,005	1,40 ± 2,02	16,23 ± 16,80	0,005
24 Wochen	2,02 ± 1,18	1,05 ± 0,65	0,074	41,65 ± 15,34	37,47 ± 6,93	0,462

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.2 FA-CZP Beschichtung im Vergleich zur HA Beschichtung

Für die langzeitstabile Beschichtung FA-CZP erscheint ein Vergleich mit HA beschichteten Implantaten sinnvoll: HA gilt ebenfalls als langzeitstabil und die Schichtdicken der beiden Materialien liegen mit 100 bzw. 120 µm in vergleichbaren Bereichen. Für beide Gruppen wurden bildanalytisch die gleichen Parameter bestimmt.

4.3.2.1 Anteil mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes

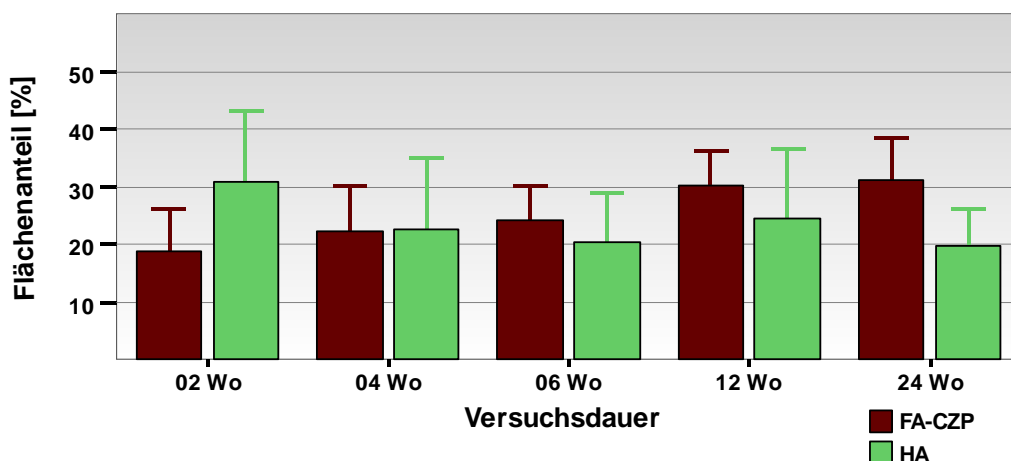


Abb. 73: Anteil mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes; Vergleich von FA-CZP- und HA- Keramik beschichteten Implantaten; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Die Flächenanteile mineralisierter Knochensubstanz der beiden Gruppen zeigen im zeitlichen Kontext konträre Verläufe (Abb.73). Implantate mit Hydroxylapatit Beschichtung haben im Mittel nach zwei Wochen die höchste Knochenapposition. Der Wert nimmt im Verlauf des *Remodeling* tendenziell ab. Demgegenüber kommt es bei der FA-CZP Gruppe zu einer kontinuierlichen Zunahme der Knochenmenge innerhalb der Messzone (Abb. 73). Die initiale Knochenneubildung ist dabei geringer im Vergleich zur HA Beschichtung, während in der 12. und 24. Versuchswoche signifikant mehr mineralisierte Knochensubstanz gemessen wird (Tab. 17).

Tab. 17: Der Anteil mineralisierter Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes zu den jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

Versuchsdauer	FA-CZP	HA	Signifikanz*
2 Wochen	18,79 ± 7,15	30,39 ± 12,24	0,023
4 Wochen	22,26 ± 8,23	22,62 ± 12,47	0,606
6 Wochen	24,29 ± 4,68	20,50 ± 8,60	0,245
12 Wochen	30,32 ± 6,20	24,53 ± 12,55	0,096
24 Wochen	31,21 ± 7,70	19,67 ± 6,69	0,002

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.2.2 Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes

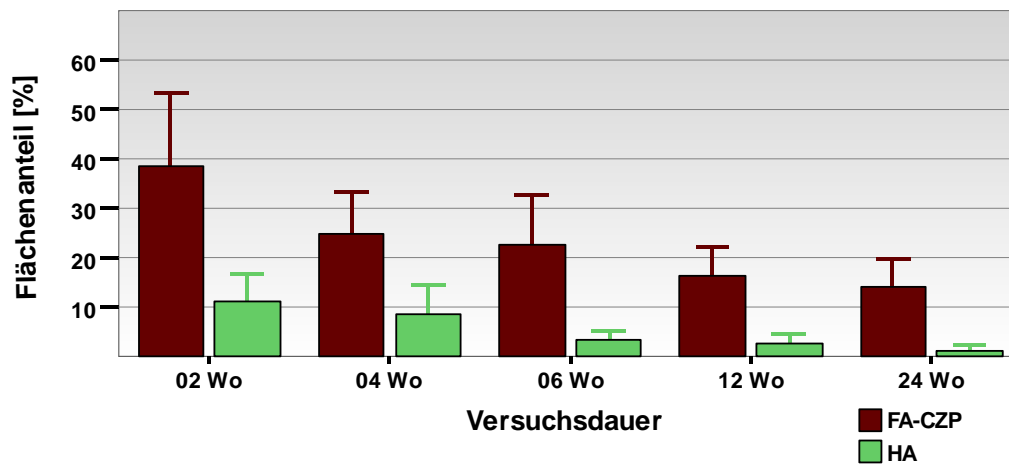


Abb. 74: Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes; Vergleich von FA-CZP- und HA- Keramik beschichteten Implantaten; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Hoch signifikante Unterschiede bestehen hinsichtlich des Anteils von Osteoid an der mineralisierten Knochensubstanz (Tab. 18). Dieser beträgt innerhalb der FA-CZP Gruppe ein Vielfaches der für HA beschichtete Implantate gemessenen Werte (Abb. 74). Bei beiden Implantattypen besteht das Maximum innerhalb der frühen Phase der Knochenneubildung mit 38,61% für FA-CZP und 11,13% für HA. Dabei nimmt der Mineralisierungsgrad mit fortschreitender Versuchsdauer zu und nimmt mit dem Abschluss des Versuchs Mittelwerte von 14,12% für FA-CZP bzw. 1,3% für HA an (Tab. 18).

Tab. 18: Der Anteil Osteoid an mineralisiertem Knochen innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

Versuchsdauer	FA-CZP	HA	Signifikanz*
2 Wochen	38,61 ± 12,93	11,13 ± 4,95	0,000
4 Wochen	24,99 ± 7,57	8,80 ± 4,37	0,000
6 Wochen	22,57 ± 8,07	3,38 ± 1,56	0,000
12 Wochen	16,31 ± 4,12	2,51 ± 1,56	0,000
24 Wochen	14,12 ± 5,42	1,30 ± 0,90	0,000

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.2.3 Kontakt mineralisierter Knochensubstanz zur Beschichtung (in %)

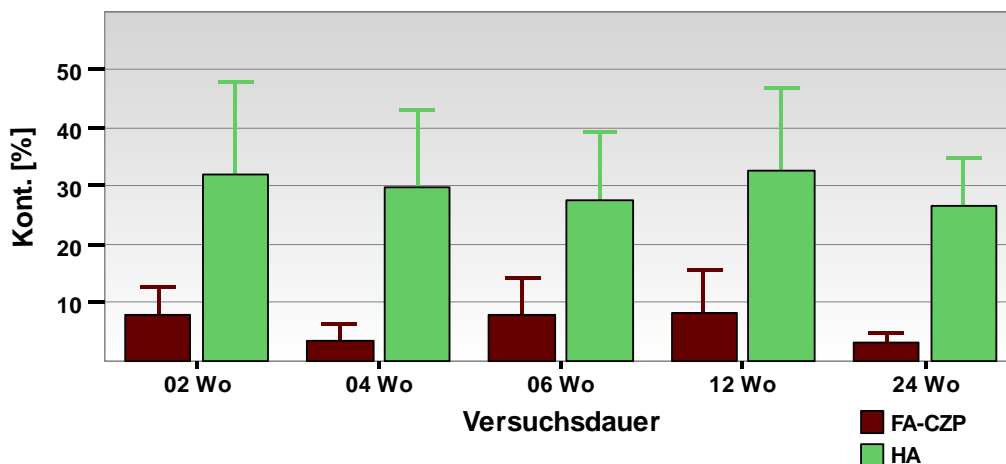


Abb. 75: Kontaktfläche zwischen Keramikoberfläche und mineralisierter Knochensubstanz (in %) bezogen auf den Implantatumfang; Vergleich FA-CZP- und HA- beschichteter Implantate; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Ebenso deutlich wie der Mineralisierungsgrad unterscheiden sich auch die Flächenanteile der Beschichtung, die mit mineralisierter Knochensubstanz Kontakt haben zwischen den beiden Gruppen (Abb. 75). Während die Kontaktfläche für die HA Beschichtung während des gesamten Versuchs rund 30,00% (mit Schwankungen innerhalb der einzelnen Zeiträume) beträgt, werden für Implantate mit FA-CZP Beschichtung hoch signifikant niedrigere Werte gemessen, die zwischen maximal 8,09% in der 12. Versuchswoche und 3,03% in der 24. Versuchswoche liegen (Tab. 19).

Tab. 19: Der Kontakt mineralisierter Knochensubstanz zur Beschichtung innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

Versuchsdauer	FA-CZP	HA	Signifikanz*
2 Wochen	7,98 ± 3,79	32,49 ± 15,52	0,000
4 Wochen	3,52 ± 2,55	29,91 ± 13,51	0,000
6 Wochen	7,85 ± 5,07	27,67 ± 11,82	0,000
12 Wochen	8,09 ± 6,77	32,58 ± 14,84	0,000
24 Wochen	3,03 ± 1,60	26,61 ± 8,50	0,000

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.3 Calciumtitanat Beschichtung im Vergleich zu Ti6Al4V Implantaten

Aufgrund der Ähnlichkeit der dünnen Calciumtitanat Beschichtung und der Metallgrundkörper hinsichtlich ihrer oberflächentopographischen und oberflächenchemischen Eigenschaften werden die mittels Bildanalyse gewonnenen Daten gleicher Parameter dieser beiden Implantattypen miteinander verglichen.

4.3.3.1 Anteil mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes

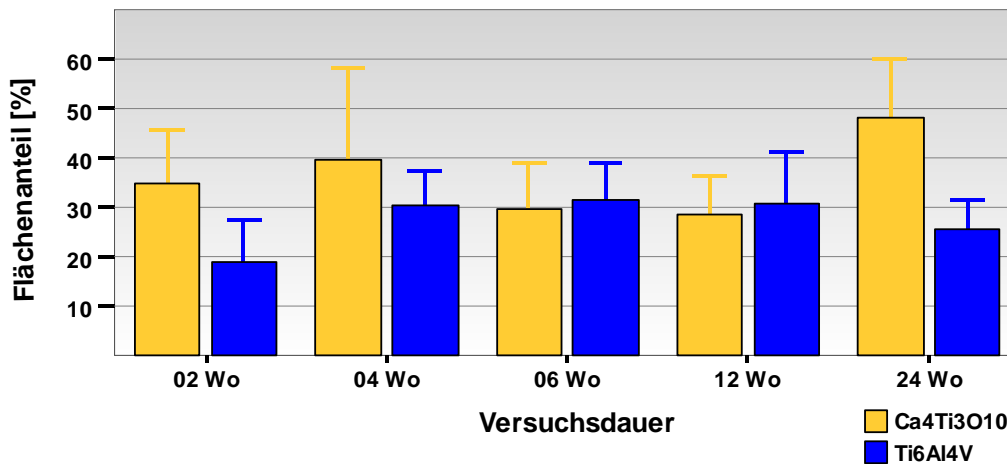


Abb. 76: Anteil mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes; Vergleich von Ca4Ti3O10 beschichteten Implantaten und unbeschichteten Ti6Al4V- Probekörpern; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

An Implantaten mit Calciumtitanat Beschichtung findet initial eine signifikant höhere Knochenneubildung statt als bei Ti6Al4V Implantaten ohne Oberflächenvergütung (Tab. 20). Diese Tendenz setzt sich über die gesamte Versuchsperiode fort (Abb. 76). Während im Verlauf des *Remodeling* der Anteil mineralisierter Knochensubstanz um die Titanimplantate sinkt, ist bei mit Calciumtitanat beschichteten Implantaten zur 24. Versuchswoche eine signifikante Zunahme der Knochenmenge zu verzeichnen (Tab. 20).

Tab. 20: Der Anteil mineralisierter Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten ; Mittelwerte und Standardabweichungen

Versuchsdauer	Ca4Ti3O10	Ti6Al4V	Signifikanz*
2 Wochen	34,72 ± 11,17	18,94 ± 8,91	0,009
4 Wochen	39,61 ± 19,52	30,42 ± 7,34	0,401
6 Wochen	29,57 ± 9,78	31,46 ± 7,77	0,606
12 Wochen	28,56 ± 7,73	30,68 ± 11,18	0,529
24 Wochen	48,10 ± 12,54	25,66 ± 6,03	0,002

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.3.2 Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes

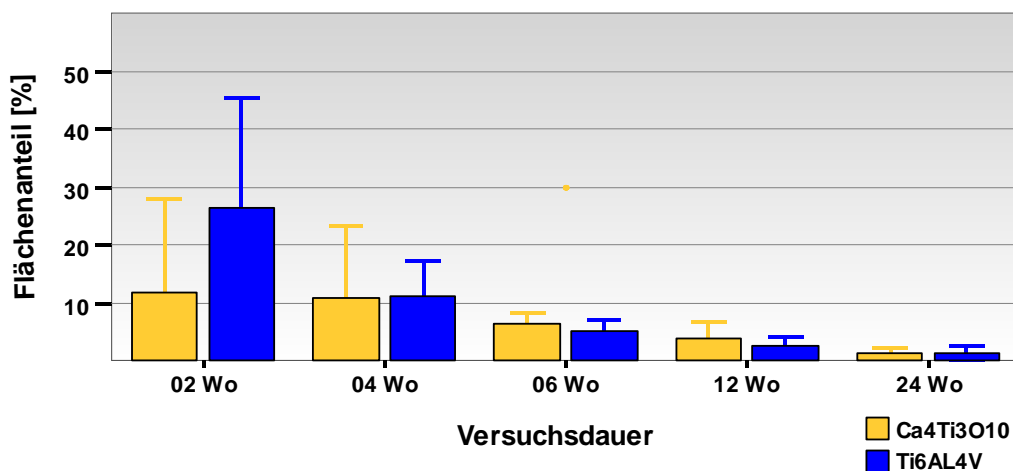


Abb. 77: Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz (in %) innerhalb des Messfeldes; Vergleich von Ca4Ti3O10 beschichteten Implantaten und unbeschichteten Ti6Al4V- Probekörpern; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Der innerhalb der Initialphase (zwei Wochen post op.) im Bohrlochdefekt angebildete Knochen erreicht bei Implantaten der Calciumtitanat Gruppe einen signifikant höheren Mineralisierungsgrad im Vergleich zu reinen Ti6Al4V Oberflächen (Tab. 21). Mit fortschreitender Versuchsdauer zeigen die Daten annähernd gleiche Wertigkeiten ohne signifikante Unterschiede (Tab. 21). Ab der vierten Versuchswoche kann von einem synchronen Verlauf der Knochenreifung ausgegangen werden (Abb. 77).

Tab. 21: Der Anteil Osteoid an mineralisiertem Knochen innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

Versuchsdauer	Ca4Ti3O10	Ti6Al4V	Signifikanz*
2 Wochen	11,70 ± 15,82	26,29 ± 16,34	0,016
4 Wochen	10,94 ± 9,43	11,04 ± 5,94	0,674
6 Wochen	6,33 ± 1,61	5,04 ± 1,26	0,093
12 Wochen	3,70 ± 1,81	2,50 ± 1,48	0,172
24 Wochen	1,38 ± 0,71	1,31 ± 1,15	0,462

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.3.3.3 Kontakt mineralisierter Knochensubstanz (in %) zur Beschichtung bzw. zum Metall

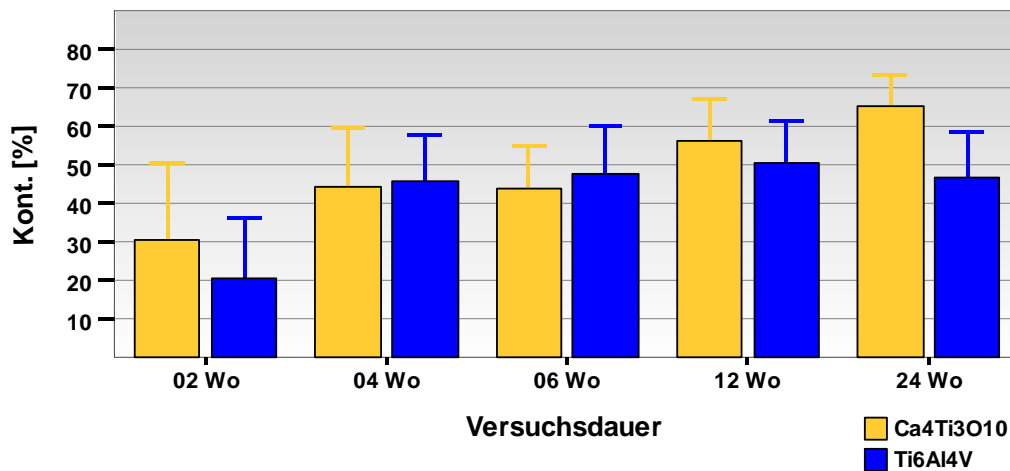


Abb. 78: Kontaktfläche zwischen Implantatoberfläche und mineralisierter Knochensubstanz (in %) bezogen auf den Implantatumfang; Vergleich von Ca4Ti3O10 beschichteten Implantaten und unbeschichteten Ti6Al4V- Probekörpern; Mittelwerte und Standardabweichungen zu den einzelnen Versuchszeiten

Die Anteile der Implantatoberflächen, die in Kontakt mit mineralisierter Knochensubstanz stehen, weisen statistisch mit Ausnahme der letzten Versuchszeit, 24 Wochen post op., keine signifikanten Unterschiede auf (Tab. 22). Am Versuchsende liegen dabei für die Beschichtung signifikant höhere Werte vor. Insgesamt werden über den gesamten Versuchszeitraum hinweg regelmäßig mehr als 30,00 % der Calciumtitanat Oberfläche von mineralisiertem Knochen bedeckt (Abb. 78).

Tab. 22: Der Kontakt mineralisierter Knochensubstanz zur Beschichtung bzw. zum Metall innerhalb der jeweiligen Versuchszeiten; Mittelwerte und Standardabweichungen

<i>Versuchsdauer</i>	<i>Ca4Ti3O10</i>	<i>Ti6Al4V</i>	<i>Signifikanz*</i>
2 Wochen	30,41 ± 19,57	20,73 ± 16,04	0,345
4 Wochen	44,52 ± 15,32	45,83 ± 9,98	0,834
6 Wochen	44,11 ± 10,00	47,74 ± 12,83	0,439
12 Wochen	56,59 ± 8,34	50,70 ± 10,64	0,462
24 Wochen	65,12 ± 8,79	46,99 ± 12,17	0,009

* Mann-Whitney-U Test bei zwei Stichproben

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Versuchszeitraum 2 Wochen

Die knöcherne Reparatation der Defektzone findet in der frühen Heilungsphase, zwei Wochen post operationem, bei 602020, GB14, HA und Ca4Ti3O10 auf ähnlichem Niveau statt. Bei Ti6Al4V und FA-CZP ist die Knochenneubildungsrate reduziert. HA und GB14 erreichen ähnliche Werte hinsichtlich des Knochenkontakts. Für Calciumtitanat sind die Werte ca. ein Drittel niedriger. FA-CZP und 602020 weisen am wenigsten Kontakt mineralisierter Knochensubstanz zur Beschichtung auf. Morphologisch wird das repräsentiert durch unverkalkte Knochenmatrix im *Interface*. Signifikant höhere Werte zeigt GB14 gegenüber 602020 und HA im Vergleich zu FA-CZP. Das auffällige histologische Bild bei 602020 ist gekennzeichnet durch starke Zellreaktionen (Proliferation von Osteoblasten) in Verbindung mit massiven Lösungsprozessen der Keramik, die bereits Substanzdefekte zeigt.

Versuchszeitraum 4 Wochen

Die Osteointegration läuft physiologisch ab bei GB14-, HA-, Ca4Ti3O10- und Ti6Al4V- Implantaten und geht demzufolge vier Wochen post operationem unmittelbar in die Knochenreifung über. Der Mineralisierungsgrad des Knochens der Implantate mit GB14-, HA-, Ca4Ti3O10- Beschichtungen hat deutlich zugenommen. Hinsichtlich dieses Parameters gibt es signifikante Unterschiede zwischen GB14 und 602020, bzw. HA und FA-CZP.

Der neu gebildete Knochen von 602020 und FA-CZP beschichteten Implantaten weist dagegen im Vergleich zu allen anderen Materialien fortbestehend hohe Anteile an Osteoid auf. Das heißt der Mineralisierungsgrad des neu gebildeten Knochens im Bereich dieser Implantate ist niedrig.

Ca4Ti3O10 beschichtete Implantate haben verglichen mit den Keramikbeschichtungen GB14 und HA höhere Osteoidanteile und zeigen gleichzeitig eine Steigerung des Knochenkontakts (als Ausdruck einer im Vergleich zu dicken Schichten oder Keramiken verzögerten Knochenneubildung und Knochenreifung). Signifikanzunterschiede hinsichtlich des Knochenkontakts bleiben innerhalb der jeweiligen Implantatgruppierungen erhalten.

Versuchszeitraum 6 Wochen

In der Stabilisierungsphase (sechs Wochen Liegezeit) zeigen sich deutliche morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Keramikbeschichtungen. Mit Einsetzen des *Remodeling* des neu gebildeten Faserknochens bei GB14, Ca4Ti3O10 und HA wird die Anzahl der Trabekel im Bereich der ehemaligen Defektzone zugunsten zunehmender Mächtigkeit der einzelnen Trabekel reduziert. Um Implantate mit 602020 und FA-CZP- Beschichtung bildet sich ein kompakter Knochenring. Das histologische Bild ist bei FA-CZP durch massive Partikelfreisetzung aus der Beschichtung gekenn-

zeichnet, verbunden mit der Persistenz eines breiten Saums unverkalkter kollagener Strukturen im *Interface*.

Versuchszeitraum 12 Wochen

12 Wochen nach der Implantation befindet sich bei GB14 und Ca4Ti3O10 sowie innerhalb der Kontrollgruppen reifer Lamellenknochen im Kontakt zum Implantat. Bei GB14 wird mit Verschwinden der Beschichtung auch knöcherner Kontakt zum Metallsubstrat aufgenommen. Die Knochenmenge um die GB14 Beschichtung ist signifikant geringer im Vergleich zu 602020 Beschichtungen. Gleichzeitig weisen GB14 beschichtete Implantate signifikant mehr Knochenkontakt auf. 602020 beschichtete Implantate stellen über Osteoid Kontakt zum Metall her. In Assoziation zu den 602020 Beschichtungen sind fortgesetzt aktive Osteoblasten vorhanden und eine unverkalkte amorphe Grundsubstanz füllt das *Interface* aus.

Im Unterschied dazu findet man bei FA-CZP beschichteten Implantaten faserartige Formationen kollagenen Bindegewebes ohne aktive Osteoblasten. Implantate mit Ca4Ti3O10 bzw. die aus reiner Titanlegierung werden spangenartig durch Knochentrabekel umschlossen. Mit Ausnahme von FA-CZP wird bei allen Implantaten eine Steigerung des Mineralisierungsgrades gesehen, wobei fortgesetzt signifikante Unterschiede hinsichtlich dieses Parameters zwischen 602020 und GB14, bzw. HA und FA-CZP gesehen werden. Bei 602020 halbiert sich der Osteoidanteil als Ausdruck nun einsetzender Knochenreifung.

Versuchszeitraum 24 Wochen

Am Ende des Versuchszeitraums sind die Implantate mit den Materialien GB14, 602020 und Ca4Ti3O10 und die der Kontrollgruppen regelrecht in das Knochenlager integriert.

Im Vergleich zu GB14 weisen Implantate mit 602020 Beschichtung bei nunmehr angeglichenem Mineralisierungsgrad signifikant mehr Knochenvolumen auf. Der Umbauprozess für 602020 ist noch nicht abgeschlossen. In Bezug auf die Kontaktflächen mineralisierter Knochensubstanz zum Implantat bestehen zwischen GB14 und 602020 keine signifikanten Unterschiede mehr.

Calciumtitanat beschichtete Implantate zeigen eine deutliche Steigerung des Knochenvolumens im Vergleich zur 12. Versuchswoche.

FA-CZP zeigt dahingehend ein abweichendes Verhalten, dass das *Interface* fortgesetzt mit kollagenem Bindegewebe angefüllt ist, welches keine Tendenz zur Mineralisierung zeigt und somit kein Knochenkontakt zur Beschichtung aufgebaut wird. Zur Umgebung hin wird das Implantat durch einen kompakten Knochenring abgeschirmt, der aus nunmehr reifem Lamellenknochen besteht.

5 Diskussion

Bioaktive keramische Knochenersatzmaterialien besitzen die Fähigkeit, die Knochenneubildung gerichtet zu stimulieren und mit dem Knochengewebe eine stoffschlüssige Verbindung (Verbundosteogenese) einzugehen (OSBORN 1979). Um diese Eigenschaft für belastete Implantate nutzbar zu machen, werden metallische Trägermaterialien mit bioaktiven Keramiken beschichtet.

In der vorliegenden Studie wurden vier Keramikbeschichtungen auf Ti6Al4V Grundkörpern getestet, die sich neben ihrer chemischen Zusammensetzung auch in Löslichkeit, Resorbierbarkeit und Schichtdicke unterscheiden. Zu evaluieren ist, inwieweit die Materialien die Einheilung hinsichtlich Knochenneubildung, -reifung und Kontaktaufnahme zum Implantat beeinflussen.

Der Prozess der Knochenneubildung auf beschichteten und unbeschichteten Implantaten wurde in der Literatur intensiv diskutiert. Ziel ist eine Verkürzung der Zeitspanne zwischen Primärstabilität und dem Erreichen der Sekundärstabilität eines Implantats. Über die dafür notwendige chemisch biologische Stabilität keramischer Beschichtungen im knöchernen Lager bestehen im Wesentlichen zwei Meinungen:

1. Keramische Beschichtungen sollten langzeitstabil sein, um bioaktive Stimulation über den gesamten Implantationszeitraum zu garantieren (OVERGAARD et al. 1997, ROCCA et al. 1998, WILLMANN 1999).
2. Keramiken sollten synchron mit der Knochenneubildung resorbierbar sein, da sie nur zeitlich definiert benötigt werden, um den Heilungsprozess zu stimulieren. Der neu gebildete Knochen kompensiert den Substanzverlust der Beschichtung im *Interface* und das metallische Implantat wird mit dem Knochen über Kontaktosteogenese fest im Knochen verankert (DUCHEYNE und CUCKLER 1992).

An der Grenzfläche zwischen bioaktiver Keramik und dem Knochen als Wirtsgewebe laufen unmittelbar nach deren Implantation dynamische Prozesse ab, die mit der Freisetzung von Calcium- und Phosphationen assoziiert sind. Diese gelten in der Literatur als die Voraussetzung für die Bioaktivität der Materialien. Eine erhöhte Löslichkeit der Keramik bedingt eine erhöhte Reaktivität des Materials und soll so die Stimulation der Knochenneubildung verstärken (DUCHEYNE und CUCKLER 1992, DUCHEYNE und QIU 1999, DE AZA et al. 2003, PORTER et al. 2003).

Modifiziert nach HEIMANN (2004) können die Reaktionen im *Interface* wie folgt charakterisiert werden:

- I Freisetzung von Calcium- und Phosphationen (DOI et al. 1997), Stimulation von Osteoblasten
- II Präzipitation von biologischem Apatit (= biomimetischer Apatit = BCA (Biologic Carbonated Apatit) = amorpher HA = Calcium verarmter Defektapatit) auf der Keramikoberfläche (DUCHEYNE und QIU 1999, CAZALBOU et al. 2004, HEIMANN 2004)
- III Adsorption von Serumproteinen an die Apatitstruktur (DUCHEYNE und QIU 1999)
- IV Biologische Bindung von Kollagen an die modifizierte Oberfläche (CHEN et al. 2004)
Mineralisation der Kollagenmatrix (CHEN et al. 2004)

Tatsächlich sind bei den untersuchten Keramikbeschichtungen Unterschiede in Dynamik und Morphologie der Knochenheilung zu verzeichnen. *In vitro* Zelltests von BERNSTEIN et al. (2003) ergaben für 602020, GB14, FA-CZP und Ca₄Ti₃O₁₀ keine Hinweise auf Zytotoxizität der Keramiken. IGNATIUS et al. (2001) fanden für GB14 eine reduzierte *in vitro* Biokompatibilität und führten das auf die starke Löslichkeit und damit erhöhte Ionenfreisetzung der Keramik zurück. KNABE et al. (1997) dagegen, konnten mit der Absenkung der Ionenkonzentration, insbesondere Phosphationen, durch täglichen Mediumwechsel die Osteoblastenproliferation auf Calciumphosphatkeramiken des Systems Ca₂KNa(PO₄)₂ (entspricht GB14) steigern. Eine *in vivo* Studie über das Osteointegrationsverhalten verschiedener granulierter Calciumorthophosphate von MÜLLER-MAI et al. (1997) bestätigt die gute Biokompatibilität von GB14. Für GB14-, HA- und FA-CZP- Plasmaspritzschichten (GILDENHAAR et al. 2003b, GILDENHAAR et al. 2004) sowie auch für Ca₄Ti₃O₁₀ Reaktionsschichten (persönliche Mitteilung Renate Gildenhaar, Berlin, 10.01.2005), gelang der Nachweis einer biomimetischen Apatitschicht in SBF. Eine HA Formation auf 602020 Beschichtungen konnte dagegen nicht gefunden werden (GILDENHAAR et al. (2003b).

GB14 und 602020 enthalten Alkalien (Na, K, Mg). Das erhöht die Löslichkeit der Calciumorthophosphatstruktur im Vergleich zum HA (BERGER et al. 1995). *In vivo* konnten bei 602020 Beschichtungen in größerem Umfang Schichtdegradationen festgestellt werden als bei GB14 (persönliche Mitteilung Anke Bernstein, Halle/Saale, 10.01.2005). Die Schichtmorphologie der 602020 Keramik (erhöhte Rauigkeit und Porosität gegenüber GB14) bedingt eine verstärkte Löslichkeit. Zusätzlich besteht die 602020 Keramik im Gegensatz zu GB14 (einphasig) aus drei Hauptkristallphasen, deren Stabilität im biologischen Milieu wahrscheinlich jeweils unterschiedlich ist und in der Summe dann eine insgesamt höhere *in vivo* Resorbierbarkeit ergeben kann.

Die materialspezifische Löslichkeit bestimmt die Reaktivität des Materials und damit auch das Ausmaß der Ablagerung von Apatit auf der jeweiligen Oberfläche. Bei stärker löslichen Schichten überwiegt in der frühen Phase der Abbau gegenüber der Präzipitation (DING et al. 2000). Diese Beobachtung scheint auf die 602020 Beschichtung zutreffend zu sein und das, im Vergleich zu GB14 bzw. HA, abweichende *in vivo* und *in vitro* Verhalten zu bestimmen.

In vivo führen die Lösungsprodukte, vor allem Calcium- und Phosphationen, normalerweise zu einer Sättigung der Gewebsflüssigkeit im periimplantären Bereich und in der Folge zu einer Deposition biomimetischen amorphen Apatits auf der Keramikoberfläche. Diese Form des Hydroxylapatit wird durch Osteoblasten erkannt und veranlasst sie zur Knochenbildung (BARRÈRE et al. 2003). Eine Konzentrationserhöhung durch massive Ionenfreisetzung aus der Beschichtung, wie es bei 602020 wahrscheinlich passiert, kann dabei die lokale Clearancekapazität übersteigen. Die für die Abscheidung von Apatit relevanten Gleichgewichte werden gestört und so eine Ablagerung biomimetischen Apatits direkt auf der 602020 Oberfläche unmöglich gemacht. Durch „Verdünnungseffekte“ (Extrazellulärflüssigkeit, osmotische Prozesse) verlagert sich die Apatitpräzipitation an die knöcherne Begrenzung des *Interface*. Dieser Prozess begünstigt analog zu den oben erwähnten Mechanismen die Stimulation der Knochenneubildung im Defektbereich, nicht aber die Mineralisierung der Matrix auf der Keramikoberfläche. Implantate mit 602020 Beschichtung kennzeichnet eine Ansammlung nur verzögert mineralisierenden Osteoids auf der Keramikoberfläche. Die Knochenreifung findet in diesem Bereich verzögert statt. Gleichzeitig war histologisch eine gesteigerte Knochenneubildung mit besonders ausgeprägter Osteoblastenaktivität nachweisbar. Parallel mit dem Verschwinden der Beschichtung konnte auch im *Interface* mineralisierte Knochensubstanz gefunden werden. Wahrscheinlich wurde erst mit Abnahme der Schicht und der damit verbundenen Verringerung der freigesetzten Ionen eine Calciumeinlagerung in die interfazielle Knochenmatrix ermöglicht. Zum Ende des Versuchs wurde direkter Knochenkontakt zu Resten der Beschichtung bzw. zum Metallsubstrat hergestellt. Eine Osteointegration dieser Implantate wird erreicht. Auf dem Metall verbleiben flächenhaft Keramikreste, die sich nicht vom Metallsubstrat lösen.

Auch die GB14 Beschichtung unterliegt einem biologischen Abbau im knöchernen Lager. Daneben treten flächenhaft Abplatzungen der Keramik vom Metallsubstrat auf. So sind bereits nach zwei Wochen Implantationszeit Diskontinuitäten des keramischen Überzugs vorhanden. Im Gegensatz zu 602020 ist der Abbau der GB14 Keramik histomorphologisch nicht so deutlich mit einer Osteoblastenproliferation verbunden. Im Vergleich zu 602020 und HA fördert die GB14 Keramik aber innerhalb der ersten vier Wochen post implantationem die Knochenneubildung und Mineralisation und im Zuge dessen auch die Verankerung des Implantats durch Verbundosteogenese. Hier existiert eine Präzipitation von amorphem HA direkt auf der Keramik offenbar auch *in vivo*, welche die Differenzierung von Knochengewebe stimuliert und die Matrixmineralisation in Kontakt mit der GB14 Keramik ermöglicht. Bei Präparaten mit GB14 Beschichtung wird histologisch wie histomorphometrisch in allen Versuchszeiträumen Kontakt mineralisierter Knochensubstanz zur Keramik gefun-

den. Nach Resorption der Keramik wird extensiver Knochenkontakt zum Ti6Al4V Substrat des Implantats hergestellt. Mit Bedeckung der Keramik durch mineralisierte Knochensubstanz verlangsamt sich der Abbau der Schicht gemäß den Beobachtungen von RUEGER et al. (1998) und DARIMONT et al. (2002), so dass eine vollständige Resorption der Beschichtung innerhalb von 24 Wochen nicht stattfinden konnte. Abgelöste Keramikfragmente wurden in Lamellenknochen integriert. Histologisch bleibt unklar, inwieweit diese kompakten Schichtreste einem weiteren Abbau unterliegen.

Ausgehend von den Arbeiten BRANEMARKS (1983) ist die Option einer Osteointegration mit Kontaktosteogenese für Titanimplantate unbestritten. In der vorliegenden Studie wurden Implantate mit 1-2 µm dünnen Reaktionsschichten aus Ca₄Ti₃O₁₀, die auf Ti6Al4V Grundkörpern erzeugt wurden, getestet. Chemisch ist Calciumtitanat unlöslich.

Anfangs erreichen Knochenneubildungsrate und Mineralisierungsgrad bei Ca₄Ti₃O₁₀ beschichteten Implantaten ein ähnliches Niveau wie das der resorbierbaren Calciumphosphatbeschichtungen im Versuch. Gegenüber reinen Ti6Al4V Implantaten sind Knochenneubildungsrate und Mineralisierungsgrad signifikant gesteigert. Obwohl histomorphometrisch zwei Wochen post operationem für die Ca₄Ti₃O₁₀ Beschichtung Knochenkontakt von 30,41% gemessen wurde (was eine extensive Knochenanlagerung durch oberflächenvermittelte Mineralisation impliziert), konnte histologisch für diesen Versuchszeitraum keine direkte Verbindung von mineralisierter Knochensubstanz zur Implantatoberfläche bestätigt werden. Die bildanalytisch ermittelten Zahlen für den Knochenkontakt sind einer Software integrierten Sicherheitszone von vier Pixeln geschuldet. Diese wurde als Fehlerkorrektur eingeführt und soll Farbüberlagerungen durch Brechung des Lichts an der Implantatkante ausgleichen, führte in diesem Fall aber zu mangelnder Sensitivität der Messmethode.

Ab dem zweiten Untersuchungszeitraum (vier Wochen) verläuft die Mineralisation des neu gebildeten Knochens bei Ca₄Ti₃O₁₀ beschichteten und unbeschichteten Implantaten langsamer im Vergleich zu HA und GB14 beschichteten Implantaten. Vier Wochen post operationem wird direkter Knochenkontakt auf der Titanatbeschichtung histomorphometrisch und histologisch festgestellt, nicht aber auf den Vergleichspräparaten (Ti6Al4V). Bei Ca₄Ti₃O₁₀ beschichteten Implantaten kommt es im Vergleich zu unbeschichteten Probekörpern initial zu einer osteogenen Stimulation der Defektheilung. Auch KOKUBO et al. (2003), sowie MÜELLER et al. (2003) konnten mit Oberflächenvergütungen eine Verbesserung der biologischen Integrationsfähigkeit von Titanimplantaten erreichen. Verantwortlich für dieses Verhalten sind funktionelle Gruppen (beispielsweise OH Gruppen) auf der Oberfläche, die in der Lage sind, die Ablagerung von biomimetischem Apatit zu induzieren (KOKUBO et al. 2003).

Calciumtitanatkeramiken verfügen über piezoelektrische Eigenschaften. Das kann zusätzlich zu einer Stimulation der Knochenformation führen und zur Determination der Unterschiede in der Dynamik der Osteointegration von Implantaten mit Calciumtitanatbeschichtung im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten beitragen. Innerhalb der Knochenphysiologie stellen piezoelektrische Eigenschaften wahrscheinlich eine Schlüsselfunktion der funktionsgerechten Adaptation des Knochenge-

webes dar (ANON. 2002). Dadurch sind implantierte piezoelektrische Keramiken möglicherweise in der Lage, als Biosignal für eine gerichtete Stimulation der Osteogenese zu wirken (FENG et al. 1991, FENG et al. 1997, BERNSTEIN et al. 2002).

Auffällig ist ein anhaltendes *Remodeling* zwischen 12 und 24 Wochen bei $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ beschichteten Implantaten, das durch eine Steigerung des Knochenvolumens und des Knochenkontaktes im Messfeld angezeigt wird. Dieser Effekt wird auch von anderen Autoren für Titanimplantate nach 12 (GOLDBERG und JINNO 1999), bzw. 24 Wochen (HURÉ et al. 1996) beschrieben und mit anhaltenden Adaptationsprozessen an die lokale Belastungssituation begründet.

Fluorapatit enthaltende Keramikbeschichtungen versprechen geringere Resorptionsraten im biologischen Milieu als herkömmliche HA Beschichtungen (OVERGAARD et al. 1997). Sie werden deshalb angewendet, um die mit Schichtresorptionen assoziierten Nachteile für die Langzeitstabilität von Implantaten zu umgehen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte auch die FA-CZP Beschichtung geprüft werden. Im Gegensatz zu allen anderen von uns getesteten Beschichtungen, für die eine Osteointegration nachweisbar stattfand, kam es bei FA-CZP beschichteten Implantaten primär bestehend und über den gesamten Beobachtungszeitraum fortgesetzt zu keiner Befestigung im Knochen. Verantwortlich dafür ist ein Ausbleiben der Mineralisation der Gewebestrukturen im *Interface*. Vier Wochen nach der Implantation in den Knochen beginnt eine Verbreiterung des Osteoidsaums im Bereich der Keramikoberfläche. Osteoid bzw. Bindegewebe persistieren im *Interface* bis zur 24. Versuchswoche. Es findet keine Ca-Einlagerung in die kollagenen Strukturen statt. Diese zeichnen sich durch einen gerichteten Faserverlauf aus.

Ab der sechsten Versuchswoche kommt es massiv zur Freisetzung von Partikeln aus der Beschichtung, die im *Interface* und im umliegenden Gewebe abgelagert und teilweise von Riesenzellen phagozytiert werden. Die Ergebnisse der Histomorphometrie bestätigen das histologische Bild. Über die gesamte Versuchszeit hinweg ist der Mineralisierungsgrad des Knochens sowie der Kontakt mineralisierter Knochensubstanz zum Implantat von FA-CZP beschichteten Implantaten signifikant geringer, als bei HA beschichteten Implantaten.

Parallel zu den histomorphometrisch und histologisch gewonnenen Daten wurden innerhalb einer weiteren Promotionsarbeit Ausstoßversuche gemacht, die die mechanische Belastbarkeit des Knochen-Implantatverbundes für die jeweiligen Beschichtungen dokumentierten (persönliche Mitteilung Anke Bernstein, Halle/Saale, 24.05.2005). Diese Ergebnisse zeigen eine reduzierte Haftfestigkeit der FA-CZP beschichteten Implantate. Die graphische Darstellung der Ergebnisse von Ausstoßversuchen in Abb. 80 zeigt, dass FA-CZP über die gesamte Versuchszeit hinweg konstant niedrige Scherfestigkeiten aufweist, die keine deutliche Tendenz zum Anstieg haben.

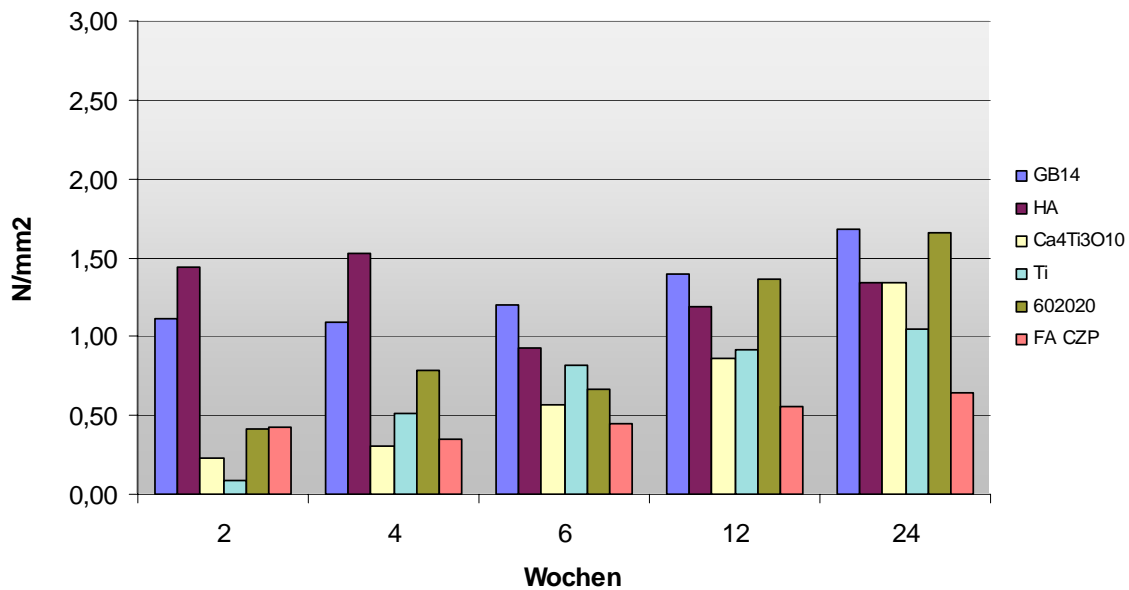


Abb. 79: Mittelwerte der Ausstoßarbeit* für die Spongiosa in N/mm^2 der jeweiligen Implantattypen in Abhängigkeit von der Implantationszeit; Vergleich von GB14-, 602020-, FA-CZP, HA-, $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ - und unbeschichteten Ti6Al4V Implantaten; (persönliche Mitteilung Anke Bernstein, Halle/Saale, 24.05.2005)

*Ausstoßarbeit = Kraft, die aufgewendet werden muss, um das Implantat vom Knochen per Stoß zu trennen

Die Persistenz von unmineralisiertem Gewebe kann von den chemischen Eigenschaften der Keramikbeschichtung ebenso abhängig sein wie von deren mechanischer Stabilität. Im Vorfeld der *in vivo* Studie gab es unter diesen Gesichtspunkten keine Anhaltspunkte dafür, dass die FA-CZP Keramik als Beschichtungsmaterial grundsätzlich ungeeignet ist: So ergaben die Biokompatibilitätstests (BERNSTEIN et al. 2003) keine Hinweise auf eine verminderte Biokompatibilität. Der Nachweis einer biomimetischen Apatitschicht *in vitro*, wie er für die FA-CZP Beschichtung erbracht wurde, impliziert eher bioaktive Eigenschaften (GILDENHAAR et al. 2003b, GILDENHAAR et al. 2004). Einzelbestandteile dieser Keramik, Fluorapatit und Zirkon, werden klinisch eingesetzt. So findet Zirkon als Zirkonoxid in der Endoprothetik als Material für Hüftköpfe Anwendung. Das Material gilt als biokompatibel (WINTERMANTEL und HA 1998). Auch Zirkonoxidpartikel haben lediglich ein geringes Potential zur Modulation von Entzündungsprozessen (WARASHINA et al. 2003). Für Fluorapatitbeschichtungen (FA) wurden experimentell Bioaktivität und der HA Beschichtung vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Knochenkontakts nachgewiesen (OVERGAARD et al. 1997, CLEMENS et al. 1998, ROCCA et al. 1998). Auch hinsichtlich der Schichtstabilität zeigt die FA-CZP Beschichtung gute Haftfestigkeiten zum Metallsubstrat (GILDENHAAR et al. 2003a).

Histomorphologisch finden sich folgende Hinweise, die Ansätze zur Klärung der mangelhaften biologischen Verankerung FA-CZP beschichteter Implantate bieten:

Innerhalb der Plasmaspritzschicht selbst scheint ein mangelhafter Verbund der Keramikbestandteile zu herrschen, der eine Freisetzung von Partikeln ermöglicht. Keramikbestandteile in der Implantatumgebung können zu einer chronisch proliferativen Gewebsreaktion ähnlich einer Fremdkörperreaktion (STÜNZI und WEISS 1990) geführt haben, welche histomorphologisch durch das Vorhandensein mehrkerniger Riesenzellen und der Proliferation fibröser kollager Gewebsstrukturen gekennzeichnet ist. Durch einen massiven Knochenring, der sich peripher an die Zone unverkalkten Gewebes anschließt, werden die Freisetzungserzeugnisse der Keramik gegen den Wirtsknochen abschirmt und das Implantat so stabilisiert.

Relativbewegungen von Implantaten werden vom Organismus ebenfalls mit der Einscheidung dieses Materials mittels straffen Bindegewebes beantwortet (ASPENBERG et al. 1992, SØBALLE et al. 1992). Solche Mikrobewegungen sind aufgrund der massiven Freisetzung von Keramikpartikeln aus der Beschichtung, die sich in einer Art Korona um das Implantat herum ansammeln, denkbar. Dadurch kann die ursprüngliche *press fit* Verankerung nicht aufrechterhalten werden. Das Implantat „schwimmt“ sozusagen innerhalb der Auslaugungszone der Keramik.

Ähnlich den von uns gemachten Beobachtungen berichten GROSS et al. (2004) von der Etablierung einer bis zu 150 µm dicken Schicht unmineralisierten Knochens im *Interface* von Calciumzirkonphosphat-Keramiken. Die Autoren mutmaßen, dass Auslaugungsprodukte der Keramik die Bildung oder Funktion von Matrixvesikeln beeinträchtigen oder die autokatalytische Abscheidung von Apatit auf der Knochenoberfläche stören und darüber die Mineralisation im Interface ausbleibt. Über Partikelfreisetzung liegen keine Angaben der Autoren vor.

Erste Hinweise auf toxische Effekte der Zirkoniumionen, die innerhalb der FA-CZP Keramik möglicherweise in löslicher Form vorliegen, ergaben sich aus Zellkulturversuchen mit getrennten Bestandteilen der ursprünglichen FA-CZP Keramik (persönliche Mitteilung Anke Bernstein, Halle/Saale 24.05.2005)

Welcher Bestandteil bzw. welche Eigenschaft der FA-CZP Beschichtung für die ausbleibende Osteointegration verantwortlich ist/sind, konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt werden. Dazu sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Eine Vielzahl von Faktoren bestimmt das Osteointegrationsverhalten keramischer Beschichtungen. Als Parameter, die von Seiten des Materials großen Einfluss ausüben, konnten innerhalb der Studie das Lösungsverhalten, die chemische Zusammensetzung, die Schichtdicke und Haftfestigkeiten innerhalb der Beschichtungen bzw. zum Metallsubstrat herausgestellt werden.

Die mit abbaubaren Keramiken beschichteten Implantaten erzielten Ergebnisse zeigten, dass diese Materialien vergleichbare Vorteile hinsichtlich der bioaktiven Stimulation der Knochenheilung, gegenüber unbeschichteten Implantaten, bieten wie sie in der Literatur für thermisch gespritzte HA-, bzw. TCP-Schichten beschrieben wurden (siehe 2.3 *Resorbierbarkeit/ Löslichkeit und biologische Reaktionen auf Calciumphosphatkeramik-Beschichtungen im Knochengewebe*). Das gilt für die GB14 Beschichtung in vollem Umfang und eingeschränkt für die 602020 Beschichtung.

Die GB14 Keramik fördert dabei in größerem Maße als die herkömmliche HA Beschichtung die Neubildung und Differenzierung von Knochengewebe auf ihrer Oberfläche und verhilft dem Knochen zu großflächigem und bindegewebsfreien Kontakt. Besonders deutlich wird dieser Effekt in den Ergebnissen der ersten vier Wochen. Die positive Beeinflussung der Knochenneubildung innerhalb der Initial- und Stabilisierungsphase der Knochenheilung determiniert gleichzeitig die Vorteile degradierbarer Calciumphosphatbeschichtungen. Bioaktive Calciumphosphatbeschichtungen sind über die Stimulation der Knochenneubildung und Mineralisation in der Lage, beschleunigend auf die definitive Verankerung eines Implantats zu wirken.

Obwohl die intensive Bindungsfähigkeit über biologisch-chemische Verbindung der Calciumphosphatkeramiken mit dem Knochengewebe (OSBORN 1979, GEESINK et al. 1987, GEESINK et al. 1988) für die Einheilung und Stabilisierung von Implantaten zunächst günstig erscheint, bieten bioaktive Beschichtungen über den Beginn der Stabilisierungsphase hinaus kaum funktionelle Vorteile. So wird die Beobachtung von LINTNER et al. (2001) reproduziert, demzufolge die Ti6Al4V Oberfläche nach Verschwinden der Keramikbeschichtung durch mineralisierten Knochen bindegewebsfrei besiedelt wird. Zeitgleich nähern sich die Kinetiken der Knochenformation auf Keramik- und Titanoberflächen nach etwa vier Monaten an (BURR et al. 1993). Auch das kann durch die vorliegenden Daten gestützt werden, so dass von einer bioaktiven Stimulation durch die Keramiken über diesen Zeitraum hinaus nicht ausgegangen werden kann.

Zum anderen wird die langfristige Persistenz kompakter Calciumphosphatbeschichtungen und deren Einfluss auf die Implantatstabilität unter dem Gesichtspunkt chronischer Resorptionsvorgänge mit anhaltender Stimulation entzündungsfördernder Zellpopulationen kritisch diskutiert (OSBORN und DONATH 1984, GOTTLANDER et al. 1997, RUEGER et al. 1998, ZECHNER et al. 2003). Des Weiteren treten zeitabhängig innerhalb von Keramikbeschichtung Frakturen, Ablösungen vom Metallsubstrat, aber auch Gefügebrauchungen durch selektive Lösung von Schichtanteilen auf. Eine gesteigerte Osteointegration sorgt demzufolge nicht zwangsläufig für eine höhere Haftfestigkeit beschichteter Implantate (GONDOLPH-ZINK 1998), weil die Verbindung zwischen

Knochengewebe und Keramik bzw. dem Metallsubstrat möglicherweise stabiler ist, als innerhalb der Beschichtung selbst.

Die GB14 Beschichtung weist erhebliche Zugspannungen an der Grenzfläche zum Metall auf (GILDENHAAR et al. 2003a). Das führt zu niedrigen Haftfestigkeiten auf dem Substrat und trägt zur Entstehung der beobachteten Schichtabplatzungen bei. Der Verbund zwischen Metallsubstrat und 602020 Beschichtung erscheint stabiler im Vergleich zu GB14, da hier der Kontakt flächenhaft erhalten bleibt. Erst am Versuchsende und damit dem Verschwinden der Beschichtung gleichen sich die Merkmale GB14 und 602020 beschichteter Implantate an, beide Implantattypen werden osteointegriert.

Die mittlere Dicke der Plasmaspritzschichten betrug 100-145 μm . Diese Schichtdicken führten nicht nur zu Abplatzungen im Versuchsverlauf, sondern auch dazu, dass nach 24 Wochen noch Reste der Beschichtung vorhanden sind. Nachfolgende Untersuchungen sollten klären, ob eine Verringerung der Schichtdicke zu einer zeitigeren vollständigen Resorption führen kann. Dadurch wird eine Steigerung des prozentualen Anteils der Implantatoberfläche mit direktem Knochenkontakt und somit eine verbesserte Osteointegration erwartet. Eine erhebliche Reduktion der Schichtdicke führt aber gleichzeitig zu einer zeitlich eng begrenzten Kapazität der Bioaktivität.

Nach unseren Untersuchungen kann die Hypothese von PORTER et al. (2003), nach der eine Erhöhung der Löslichkeit einer Biokeramik auch die Stimulation von Osteoblasten fördert, für beide degradierbaren Keramiken (GB14 und 602020) gestützt werden. Eine Erhöhung der Löslichkeit führt aber als alleiniges Kriterium nicht zum Ziel, die Bioaktivität eines Materials zu erhöhen. Starke Abbaubarkeit des Beschichtungsmaterials, wie im Fall von 602020, fördert zwar die Osteoblastenproliferation, beeinflusst aber die Knochenmineralisation negativ. Wenn die Mineralisation im *Interface* ausbleibt, wird der Integrationsprozess nicht entsprechend der Gewebeneubildung gefördert. Eine Erhöhung der Löslichkeit eines Materials vermag demzufolge nur in dem Maße die Sekundärstabilität eines Implantats zu beschleunigen, wie die Mineralisation im *Interface* Schritt hält.

Im Fall optimaler gewebeleitender Eigenschaften sollte ein Gleichgewicht zwischen der Degradation der Keramik und gleichzeitig stattfindendem Aufbau von Gewebe herrschen, um die mechanische Stabilität im Reparatursprozess zu gewährleisten (HUTMACHER 2000). Ein vollständiger Abbau der Beschichtung innerhalb definierter Zeiträume sollte das Ziel sein. Unsicherheiten in Bezug auf die Langzeitprognose beschichteter Implantate, im Zusammenhang beispielsweise mit der Stabilität des Keramik-Substrat-Verbundes oder der Stimulation von Knochenresorption durch lösliche Calciumphosphate, könnten so ausgeschlossen werden.

Dünne nur einige Mikrometer betragende Schichten sind von dem oben diskutierten Problemkreis nicht betroffen und weisen bessere Haftfestigkeiten auf Metall auf, als dicke Schichten (WILLMANN 1999, HEIMANN 2004). So sind für die $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtungen, bedingt durch ihre geringe Dicke und die Unlöslichkeit des Calciumtitanats, Partikel- bzw. Ionenfreisetzungen nicht zu

erwarten, welche modulierend auf Entzündungsreaktionen wirken könnten. Außerdem können mechanische Kräfte vorteilhaft direkt auf das Metallsubstrat übertragen werden. Aus diesen Gründen kann die $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Reaktionsschicht im Hinblick auf die Langzeitstabilität des Implantat-Knochen-Verbundes günstige Bedingungen bieten. Histologisch wie histomorphometrisch konnte eine regelrechte Osteointegration der Implantate gefunden werden. Die $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ Beschichtung ermöglicht im Vergleich zur Titanlegierung initial eine Stimulation der Knochenneubildung und Mineralisierung und stellt frühzeitiger direkten Knochenkontakt her. Calciumtitanat-Reaktionsschichten sind jedoch nicht in gleichem Maße wie die Calciumphosphatbeschichtungen GB14 und HA dazu befähigt, beschleunigend auf die Apposition und Differenzierung von Knochengewebe zu wirken. Sie können jedoch als geeignete Alternative zu unbeschichteten $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ Implantaten angesehen werden, da sich $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ beschichtete Implantate sich prinzipiell wie $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ Oberflächen verhalten.

Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen ist die FA-CZP Keramik als Beschichtung für den Knochenersatz nicht geeignet. Demgegenüber stellten die resorbierbaren Keramiken, GB14 und 602020, ihre Bioaktivität unter Beweis; auch die Metalloberfläche so beschichteter Implantate wird nach Verlust des Keramiküberzugs durch reifen Knochen bindegewebsfrei besiedelt. GB14 als moderat abbaubare Schicht erzielte die besten Ergebnisse. Dünne Calciumtitanat-Reaktionsschichten sind ebenfalls bioaktiv, besitzen aber nicht das gleiche Potential osteogener Stimulation, wie die degradierbaren Calciumphosphatbeschichtungen im Test. Demzufolge sind für den klinischen Einsatz der untersuchten Verbindungen als Beschichtungsmaterialien nach dem jetzigen Kenntnisstand die resorbierbaren Keramiken zu empfehlen. Eine Alternative zur Verwendung unbeschichteter Implantate stellen dünne calciumhaltige Reaktionsschichten dar. Spezifische Materialeigenschaften der jeweiligen Beschichtungen (Löslichkeit 602020, Haftfestigkeit zum Substrat der GB14 Beschichtung, Schichtdicken der Calciumphosphatkeramiken) müssten dabei noch optimiert und an die jeweilige Indikation angepasst werden.

6 Zusammenfassung

Doreen Nöbel

Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz - Eine histologische und histomorphometrische Studie am Tiermodell

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig sowie

Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eingereicht im März 2006

118 Seiten, 22 Tabellen, 79 Abbildungen, 173 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselworte: Implantatbeschichtungen, Keramiken, Bioaktivität, Osteointegration, Resorbierbarkeit, Histologie, Histomorphometrie

Bioaktive calciumhaltige Keramiken werden als Beschichtungsmaterial auf metallischen Implantaten angewendet, um sowohl den chemisch biologischen als auch den mechanischen Anforderungen gerecht zu werden. Damit soll die Zeitspanne bis zum Erreichen der Sekundärstabilität belasteter unzeimentierter Implantate verkürzt werden. In der Vergangenheit wurde Hydroxylapatit als Beschichtungsmaterial klinisch eingeführt. Seine Verwendung kann nachweislich mit Problemen wie Schichtablösungen und Entzündungen verbunden sein. Nicht zuletzt führte die Vielzahl in Anwendung befindlicher Hydroxylapatitkeramiken, die über zum Teil sehr unterschiedliche Materialeigenschaften verfügen, zu Unklarheiten über die Langzeitstabilität solcher Beschichtungen. Generell bestehen anhaltende Diskussionen über die notwendige und erwünschte Abbaubarkeit keramischer Beschichtungsmaterialien im knöchernen Lager (Resorbierbarkeit versus Langzeitstabilität). Das erklärt die Suche nach neuen Beschichtungsmaterialien.

Unter diesem Aspekt sollte von vier neuartigen Calciumphosphatkeramik-Beschichtungen die Fähigkeit zur Osteointegration im Vergleich zur herkömmlichen Hydroxylapatitbeschichtung (APS Verfahren) bzw. unbeschichteten aufgerauten Ti6Al4V Grundkörpern qualitativ und quantitativ innerhalb dieser Arbeit untersucht werden.

Mit dem Atmosphärischen Plasmaspritzverfahren wurden eine langzeitstabile (FA-CZP) und zwei schnell resorbierbare (GB14 und 602020) Biokeramiken als Beschichtungen auf zylindrischen Ti6Al4V Grundkörpern aufgebracht. Damit wurden mittlere Schichtdicken zwischen 100 und 145 µm erreicht. Eine zweite langzeitstabile Schicht aus Ca4Ti3O10 wurde über einen Tauchprozess in einer Salzschmelze erzeugt. Diese Schicht ist nur 1-2 µm dick. Die Probekörper wurden beidseitig in die distale Femurmetaphyse von New Zealand White Kaninchen implantiert.

Nach Liegezeiten von 2, 4, 6, 12 und 24 Wochen wurden die Kaninchen eingeschläfert und die distalen Femora mit den Implantaten entnommen. Die Gruppengröße pro Implantat und Zeitraum betrug acht Tiere.

Aus den Knochenproben wurden unentkalkte Dünnschliffe hergestellt und gefärbt. Für die qualitativ histologische Untersuchung wurde die Giemsa-Färbung genutzt und die quantitativ histomorphometrische Messung erfolgte an Schliffen mit Trichrom Färbung nach GOLDNER. Die Einheilung der Implantate wurde nach den Gesichtspunkten Knochenneubildung, Knochenreifung und Knochenkontakt im zeitlichen Kontext bewertet.

Morphologie und Dynamik der Knochenheilung waren für jede Keramik anders. Die FA-CZP Keramik verursachte eine Mineralisierungsstörung im *Interface*. So wurde über den gesamten Versuchszeitraum hinweg kein direkter Knochenkontakt zur Beschichtung hergestellt. Eine Osteointegration blieb aus. Stattdessen wurden diese Implantate mit einem breiten Osteoid- bzw. Bindegewebssaum ohne Tendenz zur Mineralisierung eingeschieden. FA-CZP ist als Beschichtungsmaterial nicht zu empfehlen. Die Ca₄Ti₃O₁₀ als langzeitstabile dünne Beschichtung ermöglicht im Vergleich zu aufgerauten Ti₆Al₄V Implantaten initial eine Stimulation der Knochenneubildung und stellt -frühzeitiger als diese- direkten Knochenkontakt her. Diese Reaktionsschichten sind jedoch nicht in gleichem Maße wie die Calciumphosphatbeschichtungen GB14 und HA in der Lage, beschleunigend auf die Apposition und Differenzierung von Knochengewebe zu wirken. Die beiden schnell resorbierbaren Keramiken, GB14 und 602020, bewiesen, dass mit einer Erhöhung der Löslichkeit eine Steigerung der osteogenen Reaktivität im orthotopen Lager verbunden ist. 602020 stellte sich als stark abbaubare Beschichtung heraus. Histomorphologisch war das korreliert mit einer starken Osteoblasten- und Osteoidproliferation im *Interface*, die sekundär aber eine verzögerte Knochenreifung verursachte.

GB14 als resorbierbares Material zeigt insgesamt die besten Resultate. Die moderat abbaubare Keramikbeschichtung förderte im Vergleich zu HA die Knochenneubildung und -differenzierung. Bereits zwei Wochen post implantationem wurde extensiver Knochenkontakt zur GB14 Keramik hergestellt. Der Abbau der Beschichtung erfolgt bis 24 Wochen Versuchsdauer bei beiden resorbierbaren Keramiken GB14 und 602020 unvollständig. Kompakte Schichtreste verbleiben auf den Implantaten. Die freiwerdende Metalloberfläche wurde nach Verschwinden der Beschichtung mit reifem Lamellenknochen besiedelt.

Resorbierbare Calciumphosphatkeramikbeschichtungen können die knöcherne Integration von Implantaten fördern. Ihre Degradierbarkeit sollte dabei idealerweise mit der Knochenneubildung synchronisiert sein, um Knochenreifung und ausreichende Stabilität im *Interface* zu gewährleisten. Dünne Ca₄Ti₃O₁₀ Reaktionsschichten können die biologischen Eigenschaften unbeschichteter Titanimplantate verbessern.

7 Summary

Doreen Nöbel

Investigations of osseointegration and degradation behaviour of bioceramic coatings on implants in bone tissue. A histologic and histomorphometric animal study.

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Clinic for Orthopaedics, Faculty of Medicine, Martin Luther University Halle-Wittenberg

Submitted in March 2006

118 pages, 22 tables, 79 figures, 173 references, 1 appendix

Keywords: implant coatings, bioceramics, bioactivity, osseointegration, degradation behaviour, histology, histomorphometry

Bioactive ceramics are used as coatings on metallic implants, to combine the favourable biologic response of bioceramics with stronger mechanic properties of metal prostheses. Ceramics should enhance bone tissue formation around the prostheses surface to reduce the time between primary press fit until secondary implant stability. Since few years hydroxyapatite coatings are in clinical use. These coatings can cause problems like coating loss and inflammation. Also a variety of HA ceramics in clinical use, with a range of material characteristics led to misunderstandings about the long time stability prognosis for these coatings. However there is still discussion about the favourable degradation behaviour of ceramic coatings in vivo (degradable coatings versus stable coatings). Therefore research for better new bioceramic coating materials is still necessary.

In the present study the potential of osseointegration of four new coatings in comparison with a plasmasprayed (APS) hydroxyapatite coating and uncoated roughened titan alloy (Ti6Al4V) samples should be investigated under both qualitative and quantitative aspects. Coatings with one stable ceramic (FA-CZP) and two resorbable ceramic materials (GB14 and 602020) are made under atmospheric plasmaspray conditions on Ti6Al4V cylinders in result of an average coating thickness of 100-145 µm. A second stable coating (Ca₄Ti₃O₁₀), with a coating thickness of only 1-2 µm, was made as a dip coating in a melting process. The samples were implanted in the distal femur metaphysis region in New Zealand White rabbits. After 2, 4, 6, 12 and 24 weeks the animals were killed. They were divided in groups of 8 animals of each implantation time and coating. Undecalcified thin sections of bone – implant samples were produced and stained. For qualitative histological investigations a GIEMSA-staining was used and histomorphometric measurements were made on GOLDNER stained sections. The healing process of implants was assessed under aspects like bone growth, calcification rate and bone implant contact in each time period.

The bone healing process of each ceramic showed differences in both morphological and time response. FA-CZP ceramic coatings caused a mineralization failure of interfacing new bone tissue.

Over an implantation time of 24 weeks, no direct bone-implant contact could be established. Instead of bone there was a broad seam of osteoid or connective tissue material without any signs of mineralization in the interface. Therefore FA-CZP for use as a coating is not recommendable. A thin stable $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ coating is able to stimulate early bone formation and direct bone-implant contact in comparison with uncoated roughened Ti6Al4V ones. But these thin films on metallic implants have not the same potential to enhance bone ongrowth and early tissue differentiation as calcium phosphate coatings like GB14 and HA do. Increased solubility of a bioceramic enhanced osteogenic stimulation in orthotop bone site, as proved with the degradable GB14 and 602020 ceramic coatings. Fast degradation of 602020 led to a strong osteoblast proliferation with amounts of osteoid in the interface. These masses of matrix could not be mineralized in an ordinary time pattern. Best results of the study were achieved with a soluble GB14 bioceramic coating. GB14 degrades not as fast as 602020. In comparison to the control HA coating, GB14 enhanced bone formation and differentiation on the implants surface. Already two weeks post implantation extensive bone-ceramic contact was seen. Both soluble ceramic coatings did not fully resorb over a time period of 24 weeks. Compact rests of ceramics remained on the metallic implants surface. In locations where titanium alloy losts the coating, mature lamellar bone was in contact with the implants surface. Degradable calcium alkaline phosphate coatings can improve the process of implant osseointegration. But coating loss (resorption) has just been replaced by mineralized bone tissue to ensure mechanical implant stability within the implantation site. So solubility rate of the ceramic and bone ongrowth have to be synchronic. Thin films of $\text{Ca}_4\text{Ti}_3\text{O}_{10}$ ceramics can improve the biological response of uncoated titanium alloy implants.

8 Literaturverzeichnis

Amling M, Delling G. Osteoklastenbiologie Bedeutung im Rahmen von Knochenmetastasen. Orthopäde. 1998;27:214-23.

Amling M, Takeda S, Karsenty G. A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. BioEssays. 2000;22(11):970-75.

Amling M. Physiologie und Pathophysiologie des Skelettsystems. 3. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomechanik (29.-31.5. 2003) Instructional Course II: Biologie und mechanische Kompetenz des Knochens, 31.05. 2003; Vorsitz: Claes L, Duda G; S.2-15.

Anonymus. Piezoelectricity. 2002 (zitiert vom 30.10.02).
<<http://www.ortho.lsumc.edu/Faculty/Marino/EL/EL4/Piezo.htm>>.

Anonymus. Funktionsprinzip des atmosphärischen Plasmaspritzens. 2004 (zitiert vom 19.04.04) S.1-5
<<http://www.iplt.de/tspalt/plasmasp.htm>>.

Aspenberg P, Goodmann SB, Toksvig-Larsen S, Ryd L, Albrektsson T. Intermittent micromotion inhibits bone ingrowth Titanium implants in rabbits. Acta Orthop Scand. 1992; 63(2): 141-45.

Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBFx5 solution: influence of magnesium. Biomaterials. 2002;23: 2211-20.

Barrère F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RAJ, de Groot K, Layrolle P. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femur of goats. J Biomed Mater Res (Appl Biomater). 2003;67B:655-65.

Bartl R, Frisch B. Biopsy of bone in internal medicine. An Atlas and Sourcebook: In: Current Histopathology by Gresham GA (Consultant Editor). Volume 21 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993.

Berger G, Gildenhaar R, Ploska U, Rapid U. Rapid resorbable, glassy crystalline materials on the basis of calcium alkali orthophosphates. Biomaterials. 1995;16:1241-48.

Bernstein A, Völtzke D, Hein W. Untersuchungen zur Biokompatibilität von piezoelektrischen Keramiken. Orthop Praxis. 2002;38(12):792-94.

Bernstein A, Gildenhaar R, Nöbel D, Berger G. Biocompatibility screening of different calcium phosphate ceramics. Biomaterialien. 2003;2: 89.

Bloebaum RD, DuPont JA. Osteolysis from a press-fit hydroxyapatite implant. A case study. J Arthroplasty. 1993 Apr;8(2):195-202.

Bloebaum RD, Beeks D, Dorr LD, Savory CG, DuPont JA, Hofman AA. Complications with hydroxyapatite particulate separation in total hip arthroplasty. Clin Orthop. 1994;298:19-26.

Bobynd JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherby GC. The optimum pore size for the fixation of porous coated metal implants by the ingrowth of bone. Clin Orthop. 1980;150:263-70.

Böni T. Vom Wandel unserer Vorstellungen über die Frakturheilung und Kallusbildung. Orthopäde. 2000;29:1072-81.

Boskey AL. Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. Clin Orthop. 1981;157: 225-56.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. Journal of Prosthetic Dentistry. 1983; 399-10.

Brill W, Katthagen BD. Die Grenzschicht zwischen Hydroxylapatitkeramik und neugebildetem Knochen im Rasterelektronenmikroskop. Z Orthop. 125;183-87.

Buma P, Schreurs W, Verdonschot N. Skeletal tissue engineering-from in vitro studies to large animal models. Biomaterials. 2004; 25:1487-95.

Burr DB, Mori S, Boyd RD, Sun TC, Blaha JD, Lane L, Parr J. Histomorphometric assessment of the mechanisms for rapid ingrowth of bone to HA/TCP coated implants. J Biomed Mater Res. 1993; 27: 645-53.

Burr DB, Robling AG, Turner CH. Effect of biomechanical stress on bones in animals. Bone. 2002; 30(5): 781-86.

Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. Clin Orthop. 1998;355(Suppl):841-55.

Cazalbou S, Combes C, Eichert D, Rey C, Glimcher MJ. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. J Bone Miner Metab. 2004;22:310-17.

Chambers TJ. The origin of the osteoclast. In: Peck WA (ed): Bone and mineral research. Amsterdam: Elsevier;1989: S.1-25.

Chang CK, Wu JS, Mao DL, Ding CX. Mechanical and histological evaluations of hydroxyapatite-coated and noncoated Ti6Al4V implants in tibia bone. J Biomed Mater Res. 2001;56:17-23.

Chao EYS, Inoue N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. European Cells and Materials. 2003;6:72-85.

Chen QZ, Wong CT, Lu WW, Cheung KMC, Leong JCY, Luk KDK. Strengthening mechanisms of bone bonding to crystalline hydroxyapatite in vivo. Biomaterials. 2004;25: 4243-54.

Clemens JAM, Klein CPAT, Vriesde RC, Rozing PM, de Groot K. Healing of large (2 mm) gaps around calcium phosphate-coated bone implants: A study in goats with a follow-up of 6 months. J Biomed Mater Res. 1998;40:341-49.

Coathup MJ, Blunn GW, Flynn N, William C, Thomas NP. A comparison of bone remodelling around hydroxyapatite-coated, porous-coated and grit-blasted hip replacements retrieved at post mortem. Journal of Bone and Joint Surgery. 2000;82-B:188-23.

Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment System. Clin Orthop. 1988a;230:303-12.

Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxyapatite coated titanium for orthopaedic implant applications. Clin Orthop. 1988b;232:225-43.

Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. Orthopedic Clinics North America. 1999;30(4):591-98.

D'Antonio J, Capello WN, Manley MT. Remodeling of bone around hydroxyapatite-coated femoral stems. J Bone Joint Surg. 1996;78-A:1226-34.

Darimont GL, Cloots R, Heinen E, Seidel L, Legrand R. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. *Biomaterials*. 2002;23:2569-75.

De Aza PN, Luklinska ZB, Santos C, Guitian F, De Aza S. Mechanism of bone like formation on a bioactive implant in vivo. *Biomaterials*. 2003;24:1437-45.

de Carvalho Lopes C, König Junior B. Histological findings of bone remodeling around smooth dental titanium implants inserted in rabbit's tibias. *Ann Anat*. 2002;184: 359-362.

Dickson GR (editor). *Methods of calcified tissue preparation*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier; 1984.

Dietsch P. Osteoklasten und Knochenersatzstoffe. Vortrag; 20. Symposium und Workshop „Experimentelle Osteologie“, Halle/Saale 2.-4. Juli 2004, am 3. Juli 2004.

Ding SJ, Ju CP, Chern Lin JH. Morphology and immersion behavior of plasmasprayed hydroxyapatite/bioactive glass coatings. *Journal of Materials Science*. 2000; 11: 183-90.

Doi Y, Shibutani T, Moriwake J, Kajimoto T, Iwayama Y. Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 1997; 39: 603-10.

Donath K, Hormann K, Kirsch A. Welchen Einfluss hat die Hydroxylapatitkeramik auf die Knochenneubildung? *Mund Kiefer GesichtsChir*. 1985;9(6):438-40.

Donath K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Exakt-Kulzer-Druckschrift*, Norderstedt; 1988, S.1-16.

Ducheyne P, Cuckler JM. Bioactive prosthetic coatings. *Clin Orthop*. 1992; 276: 102-114.

Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999;20:2287- 303.

Epple M, Dorozhkin SV. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chem*. 2002; 114: 3260-77.

Fehr M. Tierschutzgerechte Euthanasie bei Kaninchen, Meerschweinchen, kleinen Nagern und Reptilien. *Prakt. Tierarzt*. 2002; 2:128-36.

Feng J, Shao Q, Weng J, Li Y, Li Y, Zhang X. An investigation on the ceramic composite of the biological piezoelectric implants. *Polymers and Biomaterials*. 1991:367-71.

Feng J, Yuan H, Zhang X. Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic. *Biomaterials*. 1997;18:1531-34.

Frost HM. Skeletal physiology and bone remodeling. In: Urist MR, editor. *Fundamental and clinical bone physiology*. Philadelphia: Lippincott;1980. S.208-41.

Frost HM. The biology of fracture healing an overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop*. 1989; 248: 283-93.

Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, Takahashi T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:672-76.

Geesink RGT, de Groot K, Klein CPAT. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings. *Clin Orthop*. 1987; 225: 147-70.

Geesink RGT, de Groot K, Klein CPAT. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg*. 1988; 70-B(1): 17-22.

Gildenhaar R, Berger G, Bernstein A, Lehmann E. Neue Biokeramiken für den Plasmaspritzprozeß. In: Degischer HP (ed.) 14. Symposium Verbundwerkstoffe und Werkstoffverbunde. Wien: WILEY-VHC; 2003a, S.732-37.

Gildenhaar R, Berger G, Bernstein A, Hein W. In vitro reactions of plasma sprayed bioceramics. *Biomaterialien*. 2003b; 2:106.

Gildenhaar R, Bernstein A, Berger G, Hein W. In-vitro surface reactions of bioceramic materials. *Key Engineering Materials*. 2004; 254-56: 407-10.

Goldberg VM, Jinno T. The bone-implant interface: a dynamic surface. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*. 1999; 9(1&2):11-21.

Gondolph-Zink B. Der Einfluß der Hydroxylapatitbeschichtung auf die Osteointegration belasteter und unbelasteter Implantate. *Orthopäde*. 1998; 27: 96-104.

Goodman SB. The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation. Bone chamber studies in rabbits. *Acta Orthop Scand (Suppl 258)*. 1994; 65:1-43.

Gottlander M, Albrektsson T. Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. *J Oral Maxillofac Implants*. 1991;6:399-404.

Gottlander M, Albrektsson T, Carlsson LV. A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *J Oral Maxillofac Implants*. 1992;7(4):485-90

Gottlander M, Johansson CB, Albrektsson T. Short- and long-term animal studies with a plasma-sprayed calcium phosphate-coated implant. *Clin Oral Impl Res*. 1997;8:345-51.

Gross U, Müller-Mai C, Berger G, Ploska U. Do calcium zirconium phosphate ceramics inhibit mineralization? *Key Engineering Materials*. 2004;Vols.254-256:635-38.

Größner-Schreiber B, Tuan RS. Die Bedeutung der Oberfläche von Titanimplantaten im Osteointegrationsvorgang. *Dtsch Zahnärztl Z*. 1991;46(10).

Gruner H. Plasmaspritzen für die Medizintechnik. 2004 (zitiert vom 22.03.2004) S.1-7
< <http://www.medicoat.ch/deutsch/plasmaspritzen.html> >.

Günther KP, Scharf HP, Pesch H, Puhl W. Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. Tierexperimentelle Untersuchung. *Orthopäde*. 1998;27:105-17.

Hacking SA, Tanzer M, Harvey EJ, Krygier JJ, Bobyn JD. Relative contributions of chemistry and topography to the osseointegration of hydroxyapatite coatings. *Clin Orthop*. 2002;1(405):24-38.

Hartmann P, Barth S, Vogel J, Jäger C. Investigations of structural changes in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *Applied Mineralogy*. 2000;1:147-50.

Hayakawa T, Yoshinari M, Kiba H, Yamamoto H, Nemoto K, Jansen JA. Trabecular bone response to surface roughened and calcium phosphate (Ca-P) coated titanium implants. *Biomaterials*. 2002;23:1025-31.

Heimann RB. Entwicklung biokeramischer Beschichtungen für Hüft-Endoprothesen Teil1. *Zeitschrift der TU Clausthal-Zellerfeld*. 2004 Okt; 15: 44-47.

Heimann RB, Vu TA, Wayman ML. Bioceramic coatings: state-of-the-art and recent development trends. *Eur J Mineral*. 1997;9:597-615.

Heimann RB, Kurzweg H, Ivey DG, Wayman ML. Microstructural and in vitro chemical investigations into plasma-sprayed bioceramic coatings. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*. 1998;43:441-50.

Heise U, Osborn JF, Duwe F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *International Orthopaedics*. 1990;14: 329-38

Hench LL, Pascha HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials in bone and muscle. *J Biomed Mater Res Symp*. 1973;4:425-29.

Higgins A. Animal research and publication ethics. *Veterinary Journal*. 2001;162:81-83.

Huré G, Donath K, Lesourd M, Chappard D, Baslé MF. Does titanium surface treatment influence the bone-implant interface? SEM and histomorphometry in a 6- month sheep study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:506-11.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000; 21: 2529-43.

Ignatius AA, Schmidt C, Kaspar D, Claes LE. In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 2001; 55: 285-94.

Jaffe WL, Scott DF. Current concepts review total hip arthroplasty with hydroxyapatite-coated prostheses. *J Bone Joint Surg*. 1996;78-A(12):1918-34

Janssen J, Laatz W. *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*. 4. Auflage. Berlin und Heidelberg: Springer; 2003

Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop*. 1981;157:259-78.

Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:55-66.

Jerosch J, Bader A, Uhr G. *Knochen Curasan Taschenatlas spezial*. Stuttgart: Thieme; 2002

Jinno T, Davy DT, Goldberg VM. Comparison of hydroxyapatite and hydroxyapatite tricalcium-phosphate coatings. J Arthroplasty. 2002;17(7):902-09.

Kaiser E, Delling G. Osteozyten - ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung. Osteologie. 2002;11(4):219-36.

Kawebulum M, Aguilar MC, Blancas E, Kawebulum J, Lehmann WB, Grant AD, Strongwater AM. Histological and radiographic determination of the age of physeal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of the new zealand white rabbit. J Orthop Res. 1994;12(5):747-49.

Katthagen BD. Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien Eine tierexperimentelle Studie. Unfallheilkunde. 1986;178.

Kettner R, Jänicke S, Schmitz HJ. Tierexperimentelle Testung einer unter Niederdruckbedingungen gespritzten Hydroxylapatitkeramikbeschichtung. Mund Kiefer Gesichts Chir. 1997;1:335-39.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(4):329-45.

Knabe C, Gildenhaar R, Berger G, Ostapowicz W, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. Biomaterials 1997;18: 1339-47.

Koch T, Berg R. Lehrbuch der Veterinär-Anatomie Band I Bewegungsapparat. 5. überarbeitete Auflage. Jena: Gustav Fischer; 1992: S. 184-209.

Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. Biomaterials. 2003;24:2161-75.

Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. 2. Auflage. Stuttgart; New York: Thieme; 1998

Kornak U, Delling G, Mundlos S. Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten. Deutsches Ärzteblatt. 2003; 100(19):1258-68.

Koster K, Karbe E, Kramer H, Heide H, König R. Experimental bone replacement with resorbable calcium phosphate ceramic. Langenbecks Arch. Chir. 1976; 341:77.

Lee TM, Wang BC, Yang YC, Chang E, Yang CY. Comparison of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings and hydroxyapatite/tricalcium phosphate composite coatings: In vivo study. J Biomed Mater Res. 2001;55:360-67.

Liebich HG. Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. 2.Auflage. Stuttgart; New York: Schattauer; 1993.

Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. Biomaterials. 2004;25:1697-1714.

Lind M, Overgaard S, Bünger C, Søballe K. Improved bone anchorage of hydroxyapatite coated implants compared with tricalcium- phosphate coated implants in trabecular bone in dogs. Biomaterials. 1999;20:803-08.

Lintner F, Böhm G, Huber M, Scholz R. Ist nach Verlust der Hydroxylapatitbeschichtung bei totalen Hüftendoprothesen nach mehrjähriger Liegezeit eine Knochenneubesiedlung der Titanlegierungsfläche möglich? Osteologie. 2001;10(1):40-53.

Mac Donald DE, Betts F, Stannic M, Doty S, Boskey AL. Physicochemical study of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implants in humans. J Biomed Mater Res. 2001;54:480-90.

Marcove RC, Arlen M. Atlas of bone pathology: with clinical and radiographic correlations: based on Henry L. Jaffe's course. Philadelphia: Lippincott; 1992.

Matsushiro A, Miyashita T. Evolution of hard-tissue mineralization: comparison of the inner skeletal system and the outer shell system. J Bone Miner Metab. 2004;22:163-69

Matthews JL: Bone structure and ultrastructure. In: Urist MR (ed.): Fundamental and Clinical Bone Physiology., Philadelphia: Lippincott; 1980, S.4-44.

Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. J Bone Joint Surg. 1958;40-A:897-910.

Mittelmeier W. Knochenneubildung im ersatzschwachen Lager mit spongiösem mineralischen Knochenersatzmaterial und autologer Markinokulation. Gräfelting: Demeter; 1992

Moroni A, Caja VL, Egger EL, Trinchese L, Chao EYS. Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants. *Biomaterials*. 1994; 15(11):926-30.

Moroni A, Toksvig-Larsen S, Maltarello MC, Orienti L, Stea S, Giannini S. A comparison of hydroxyapatite-coated, titanium-coated, and uncoated tapered external fixation pins. *J Bone Joint Surg*. 1998;80-A(4):547-54.

Müller WD, Gross U, Fritz T, Voigt C, Fischer P, Berger G, Rogaschewski S, Lange KP. Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramics particles. *Clin Oral Impl. Res*. 2003;349-56.

Müller-Mai C, Berger G, Voigt C, Bakki B, Gross U. The bony reaction to rapidly degradable glass-ceramics based on the new phase $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$. In: Sedel L, Rey C editors. *Bioceramics 10*. New York: Elsevier; 1997. S. 53-56.

Neumüller OA: *Römpps Chemielexikon*, 8. Auflage, Stuttgart: Frankh; 1979.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band I Bewegungsapparat*. 6. Auflage von Frewein J, Wille KH, Wilkens H. Berlin und Hamburg: Paul Parey; 1992.

Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM: Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev*. 1986 Oct;66(4):855-72.0

Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials*. 2004;25:4601-06.

Oosterbos CJM, Vogely HC, Nijhof MW, Fleer A, Verbout AJ, Tonino AJ et al. Osseointegration of hydroxyapatite-coated and noncoated TiAl4V implants in the presence of local infection: A comparative histomorphometrical study in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:339-42.

Osborn JF: *Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten*. Schweiz Monatsschr Zahnheilk. 1979; 89:1138-39.

Osborn JF, Donath K. Die enossale Implantation von Hydroxylapatitkeramik und Tricalciumphosphatkeramik: Integration versus Substitution. *Dtsch Zahnärztl Z*. 1984;39:970-76.

Osborn JF, Newesely H. The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1980;1: 108-11.

Osborn JF. Hydroxylapatitkeramik-Granulate und ihre Systematik. *Zahnärztl.-Mitt.* 1987 Apr;16;77(8):2-12.

Overgaard S, Søballe K, Lind M, Bünger C. Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite coatings in man. *J Bone Joint Surg.* 1997;79-B:654-59.

Owen M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis and Rheumatism*. 1980; 23(10): 1073-80.

Parfitt AM. Bone histomorphometry. Proposed system for standardization of nomenclature, symbols and units. *Calcif Tissue Int.* 1988;42:284-86.

Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D. Comments on the clinical application of fibronectin. *J Dent Res.* 1988;67:515-17.

Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999;20:1-5.

Ploska U, Berger G, Willfahrt M. A new procedure of a calcium-containing coating on implants of titanium alloy. *Key Engineering Materials*. 2004; Vols. 254-56:411-14.

Pollard TD, Earnshaw WC. *Cell biology*. Philadelphia: Saunders; 2002.

Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials*. 2003;24:4609-20.

Prallat B, Male P, Neff L, Baron R: Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. *J Bone Miner Res.* 1992;7:405-14.

Rahn BA. Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens. *Nova Acta Leopoldina*. 1976;44(226): 249-55.

Reichel H, Krüger T, Bernstein A, Hein W. Stellenwert der Hydroxylapatit-Beschichtung in der zementfreien Hüftendoprothetik: eine Standortbestimmung. *Jahrbuch Orthopädie*. 1995;169-77.

Rivas R, Shapiro F. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses. A study in the new zealand white rabbit. J Bone Joint Surg. 2002;84-A(1):85-100.

Rocca M, Orienti L, Stea S, Moroni A, Fini M, Giardino R: Comparison among three different bio-coatings for orthopaedic prostheses. An experimental animal study. Int. J Artificial Organs. 1998;21(9): 553-58.

Romeis B. Mikroskopische Technik. Böck P. (ed.) 17. Auflage. München: Urban u. Schwarzenberg; 1989.

Rueger JM. Knochenersatzmittel -Heutiger Stand und Ausblick-. Orthopäde. 1998;27:72-79.

Rueger JM, Linhart W, Sommerfeldt D. Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik- Implantationen. Tierexperimentelle Ergebnisse. Orthopäde. 1998;27: 89-95.

Sachs L. Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. 7. Auflage. Berlin und Heidelberg: Springer; 1992.

Schenk RK, Willenegger HR: Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgrösse. Unfallheilkunde. 1977;80:155-60.

Schenk RK. Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau. Unfallheilkunde. 1978;81:219-27.

Schenk RK. Bone response to grafts and implants. In: Lin OCC, Chao EYS, editors. Perspectives on biomaterials, materials science monographs 33. Taipei(Taiwan): Elsevier;1986.p.121-36.

Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. Biomaterials. 2004;25:3963-72.

Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe. Orthopäde. 2003;32:2-10.

Shapiro F. Cortical bone repair. J Bone Joint Surg. 1988;70-A:1067-80.

Simmons CA, Valiquette N, Pilliar RM. Osseointegration of sintered porous-surfaced and plasmaspray-coated implants: An animal model study of early postimplantation healing response and mechanical stability. J Biomed Mater Res. 1999;47:127-38.

Simmons CA, Meguid SA, Pilliar RM. Differences in osseointegration rate due to implant surface geometry can be explained by local tissue strains. *J Orthop Res.* 2001;19:187-94.

Søballe K, Brockstedt-Rasmussen H, Hansen ES, Bünger C. Hydroxyapatite coating modifies implant membrane formation controlled micromotion studied in dogs. *Acta Orthop Scand.* 1992;63(2):128-40.

Søballe K. Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs. *Acta Orthop Scand.* 1993;64(Suppl 255):1-58.

Soost F. Validierung des Knochenumbaus von Knochenersatzmaterialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie [Habilschr. med.]. Berlin: Humboldt-Universität; 2001.

Stea S, Visentin M, Granchi D, Cenni E, Ciapetti G, Sudanese A, Toni A. Apoptosis in peri-implant tissue. *Biomaterials.* 2000;21: 1393-98.

Stüntzi H, Weiss E. Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. 8. Auflage. Berlin und Hamburg: Paul Parey; 1990.

Stürmer KM. Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthopäde.* 1996;25: 386-93.

Stütze H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L. Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien. *Orthopäde.* 1998;27:118-25.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett GR, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Maxillofac Implants.* 2000;15:675-90.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials.* 2004;25:987-94.

Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res.* 1985;19:875-901.

Thomas KA, Cook SD. Hydroxylapatit-beschichtete metallische Implantate: Untersuchungen zu Verbindungsstärke und Histologie der Kontaktzone Knochen/Implantat. *Phillip Journal*. 1987;4(5): 287-301.

Tonino AJ, Thérin M, Doyle C. Hydroxyapatite-coated femoral stems. *J Bone Joint Surg*. 1999;81-B:148-54.

Tonino AJ, Oosterbos CJM, Rahmy A, Thérin M, Doyle C. Hydroxyapatite-coated acetabular components. *J Bone Joint Surg*. 2001; 83-A(6):817-25.

Vidigal GM Jr, Aragonés LC, Campos A Jr, Groissmann M. Histomorphometric analyses of hydroxyapatite-coated and uncoated titanium dental implants in rabbit cortical bone. *Implant Dentistry*. 1999; 8(3):295-302.

Warashina H, Sakano S, Kitamura S, Yamauchi KI, Yamaguchi J, Ishiguro N et al. Biological reaction to alumina, zirconia, titanium and polyethylene particles implanted onto murine calvaria. *Biomaterials*. 2003; 24:3655-61.

Weinlaender M, Kenney EB, Lekovic V, Beumer J, Moy PK, Lewis S. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1992;7: 491-96.

Wheeler DL, Eschbach EJ, Hoellrich RG, Montford MJ, Chamberland DL. Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *J Orthop Res*. 2000;18(1):140-48.

Wilke A, Wanner F, Wilke M, Endres S, Jäger M. Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe in vitro. Eine kritische Literaturübersicht Teil III: Keramiken. *Osteologie*. 2002; 11(3):178-203.

Willmann G. Normbestimmungen für Hydroxylapatit als Knochenersatz. *Biomed-Tech-(Berl)*. 1990 Sep; 35(9):205-07.

Willmann G. Beschichtung von Implantaten mit Hydroxylapatit: Die Option auf eine stoffschlüssige Verbindung zwischen Knochen und Metall. *Mat.-wiss.u.Werkstofftechn*. 1999; 30:317-25.

Willmann G. Oxide ceramics for articulating components of total hip replacements. In: Sedel L, Rey C, editors. Bioceramics. Oxford: Elsevier; 1997. p 123.

Wintermantel E, Ha SW. Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen, Implantate für Medizin und Umwelt. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 1998.

Wintermantel E, Bruinink A, Ruffieux K, Eckert L, et al. Tissue engineering supported with structured biocompatible materials: Goals and achievements. In: Speidel MO, Uggowitzer PJ, editors. Materials in Medicine. Zürich: VDF Hochschulverlag; 1998. S.1.

Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL. Biomaterialien- humane Toleranz und Integration. Chirurg. 1999; 70:847-57.

Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchsspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. Unfallheilkunde. 1990; 212:479-88.

Wolff J. Das Gesetz der Transformation des Knochens. Berlin: Hirschwald; 1892.

Zechner W, Tangl S, Fürst G, Tepper T, Thams U, Mailath G et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. A histologic and histomorphometric study in mini-pigs. Clin. Oral Impl. Res. 2003; 14:150-57.

Zheng X, Huang M, Ding C. Bond strength of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti composite coatings. Biomaterials. 2000; 21:841-49.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Nöbel, Doreen
Geburtsdatum, -ort:	22. 10. 1976, Meerane
Eltern:	<u>Friedrich</u> Kurt Nöbel <u>Bärbel</u> Heidi Nöbel, geb. Hartig
Familienstand:	ledig
Kinder:	keine
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildungsweg

09/1983-07/1992	Polytechnische Oberschule „Franz Mehring“ in Waldenburg
09/1992 – 06/1995	Georgius- Agricola- Gymnasium in Glauchau, Abschluss: Abitur
09/1995 – 09/1996	Freiwilliges ökologisches Jahr bei der Landesanstalt für Landwirtschaft Sachsen
10/1996 – 03/2002	Studium der Veterinärmedizin in Leipzig, Abschluss: Staatsexamen
04/2002	Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeiten

04/2002 – 10/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Orthopädie der Universität Halle- Wittenberg
04/2003 – 07/2005	Mitarbeit in der tierärztlichen Praxis Dr. Ch. Riedel, Walden- burg
ab 08/ 2005	selbständig als freie Mitarbeiterin in den tierärztlichen Praxen S. Fichtner, Waldenburg und Dr. Ch. Riedel, Waldenburg

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. W. Hein für die Überlassung des Themas.
- Frau Prof. Dr. med. vet. V. Grevel für die kritische und gründliche Durchsicht und Kontrolle meiner Arbeit aus tiermedizinischer Sicht.
- Frau Dr. Anke Bernstein für die unermüdliche wissenschaftliche Betreuung und tatkräftige Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.
- Herrn Dr. Jörg Brandt für die Einarbeitung in die Histomorphometrie und die Bereitstellung der Technik dafür.
- Frau Kornelia Vetter und dem Team des „Labors“ für die gemeinsame Bewältigung der Probenberge.
- den Kooperationspartnern der BAM, Frau Dr. Gildenhaar und Herrn Dr. Berger, für die geduldige Beantwortung offener Fragen zu den Materialien.
- Sebastian für Verständnis und Geduld während der ganzen Zeit.

Anhang

Anlage 1 : Versuchsplan Einteilung der Versuchsgruppen

* Jede Zelle entspricht einem Versuchstier

Implantat: rechts/links				
2 Wochen	4 Wochen	6 Wochen	12 Wochen	24 Wochen
Mat1 / HA*	Mat1 / HA	Mat1 / HA	Mat1 / HA	Mat1 / HA
Mat1 / HA	Mat1 / HA	Mat1 / HA	Mat1 / HA	Mat1 / HA
HA / Mat1	HA / Mat1	HA / Mat1	HA / Mat1	HA / Mat1
HA / Mat1	HA / Mat1	HA / Mat1	HA / Mat1	HA / Mat1
Mat1 / Ti	Mat1 / Ti	Mat1 / Ti	Mat1 / Ti	Mat1 / Ti
Mat1 / Ti	Mat1 / Ti	Mat1 / Ti	Mat1 / Ti	Mat1 / Ti
Ti / Mat1	Ti / Mat1	Ti / Mat1	Ti / Mat1	Ti / Mat1
Ti / Mat1	Ti / Mat1	Ti / Mat1	Ti / Mat1	Ti / Mat1
Mat2 / HA	Mat2 / HA	Mat2 / HA	Mat2 / HA	Mat2 / HA
Mat2 / HA	Mat2 / HA	Mat2 / HA	Mat2 / HA	Mat2 / HA
HA / Mat2	HA / Mat2	HA / Mat2	HA / Mat2	HA / Mat2
HA / Mat2	HA / Mat2	HA / Mat2	HA / Mat2	HA / Mat2
Mat2 / Ti	Mat2 / Ti	Mat2 / Ti	Mat2 / Ti	Mat2 / Ti
Mat2 / Ti	Mat2 / Ti	Mat2 / Ti	Mat2 / Ti	Mat2 / Ti
Ti / Mat2	Ti / Mat2	Ti / Mat2	Ti / Mat2	Ti / Mat2
Ti / Mat2	Ti / Mat2	Ti / Mat2	Ti / Mat2	Ti / Mat2
Mat3 / HA	Mat3 / HA	Mat3 / HA	Mat3 / HA	Mat3 / HA
Mat3 / HA	Mat3 / HA	Mat3 / HA	Mat3 / HA	Mat3 / HA
HA / Mat3	HA / Mat3	HA / Mat3	HA / Mat3	HA / Mat3
HA / Mat3	HA / Mat3	HA / Mat3	HA / Mat3	HA / Mat3
Mat3 / TiII	Mat3 / TiII	Mat3 / TiII	Mat3 / TiII	Mat3 / TiII
Mat3 / TiII	Mat3 / TiII	Mat3 / TiII	Mat3 / TiII	Mat3 / TiII
TiII / Mat3	TiII / Mat3	TiII / Mat3	TiII / Mat3	TiII / Mat3
TiII / Mat3	TiII / Mat3	TiII / Mat3	TiII / Mat3	TiII / Mat3
Mat4 / HA	Mat4 / HA	Mat4 / HA	Mat4 / HA	Mat4 / HA
Mat4 / HA	Mat4 / HA	Mat4 / HA	Mat4 / HA	Mat4 / HA
HA / Mat4	HA / Mat4	HA / Mat4	HA / Mat4	HA / Mat4
HA / Mat4	HA / Mat4	HA / Mat4	HA / Mat4	HA / Mat4
Mat4 / TiII	Mat4 / TiII	Mat4 / TiII	Mat4 / TiII	Mat4 / TiII
Mat4 / TiII	Mat4 / TiII	Mat4 / TiII	Mat4 / TiII	Mat4 / TiII
TiII / Mat4	TiII / Mat4	TiII / Mat4	TiII / Mat4	TiII / Mat4
TiII / Mat4	TiII / Mat4	TiII / Mat4	TiII / Mat4	TiII / Mat4

Bezeichnung der Implantattypen:

Mat1 = GB14 Beschichtung

Mat2 = Ca4Ti3O10 Beschichtung

Mat3 = 602020 Beschichtung

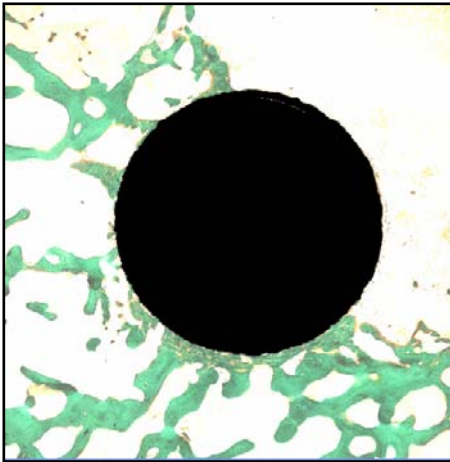
Mat4 = FA-CZP Beschichtung

HA = Kontrolle HA Beschichtung

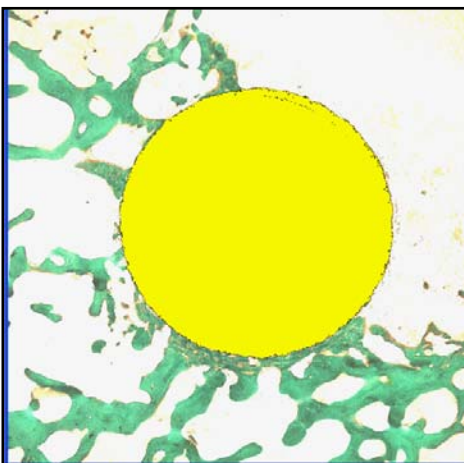
Ti = Kontrolle Ti6Al4V unbeschichtet mit glatter Oberfläche

TiII = Kontrolle Ti6Al4V unbeschichtet mit aufgerauter Oberfläche

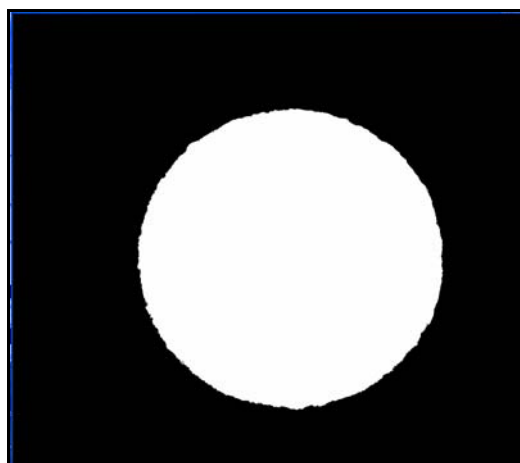
Anlage 2: Sequenzierung einzelner Strukturen digitalisierter Dünnschliffe (Masson Trichrom Goldner Färbung) mittels Bildanalyse und Zuordnung zu den histomorphometrisch bestimmten Parametern am Beispiel eines HA beschichteten Präparates



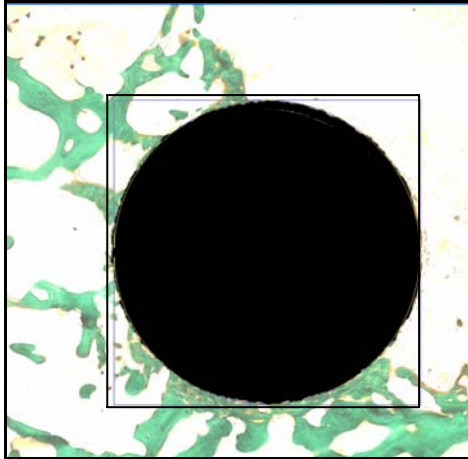
Präparat Masson-Trichrom-Goldner-Färbung; digitalisiertes Ausgabebild für die histomorphometrischen Messungen, Aufnahmegröße 2238x2240 Pixel



graphisches Overlay für Implantat (gelb)
interaktiv markiert



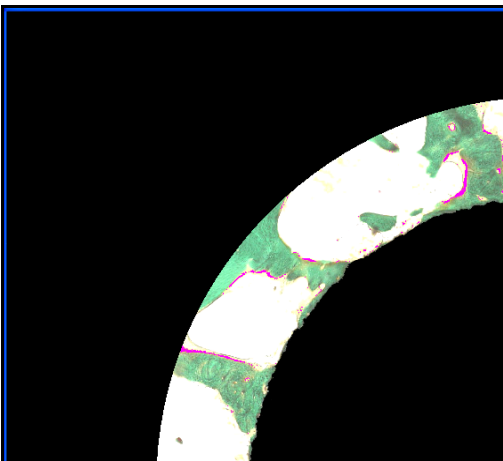
Sequenzierung des Implantats; der Implantatumfang bildet die Grundlage der Berechnung des Knochenkontakts zum Implantat



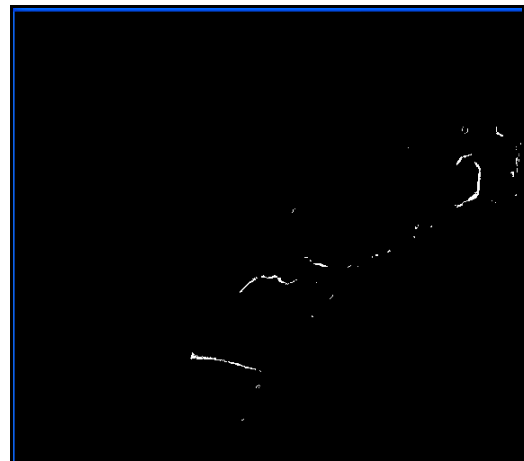
Interaktive Bestimmung der Messzone um das Implantat auf der Grundlage des Implantatumfangs



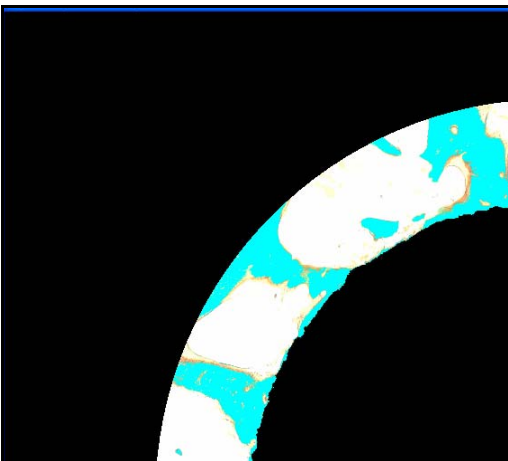
Automatische Festlegung der Messzone



Osteoid interaktiv markiert (violett)



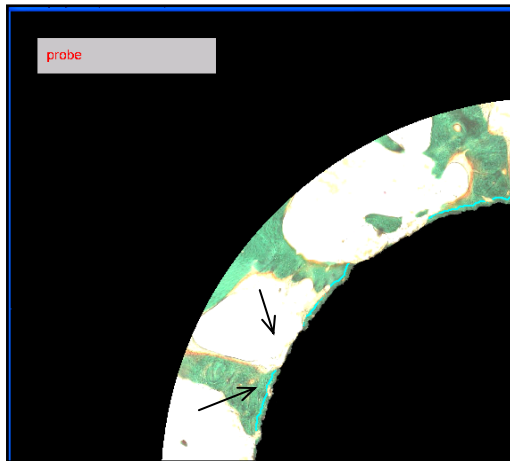
Sequenzierung des Osteoid durch die Bildanalyse



Knochen interaktiv markiert (türkis)



Sequenzierung des Knochens durch die Bildanalyse



Sequenzierung der Kontaktflächen Knochen-
Implantat durch die Bildanalyse

Anlage 3 : Statistischer Vergleich der Versuchsgruppen nach Implantationszeiten und Untersuchungsparametern

BV/TV [%]	= Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes in %
Osteoid/Os [%]	= Anteil Osteoid an mineralisierter Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes in %
Kont_Be_Os [%]	= Kontaktfläche Knochen zur Beschichtung in %
Kont_Be_Osteoid [%]	= Kontaktfläche Osteoid zur Beschichtung in %
Kont_Met_Os [%]	= Kontaktfläche Knochen zu Metall in %
Kont_Met_Osteoid [%]	= Kontaktfläche Osteoid zu Metall in %
Kont [%]	= Kontaktfläche Knochen Implantat in %

Vergleich 602020 und GB14: 2 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	602020	7	7,71	54,00
	GB 14	8	8,25	66,00
	Gesamt	15		
Osteoid/Os [%]	602020	7	6,71	47,00
	GB 14	8	9,13	73,00
	Gesamt	15		
Kont_Be_Os [%]	602020	7	4,00	28,00
	GB 14	8	11,50	92,00
	Gesamt	15		
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	7	7,57	53,00
	GB 14	8	8,38	67,00
	Gesamt	15		
Kont_Met_Os [%]	602020	7	6,50	45,50
	GB 14	8	9,31	74,50
	Gesamt	15		
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	7	7,29	51,00
	GB 14	8	8,63	69,00
	Gesamt	15		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Mann-Whitney-U	26,000	19,000	,000	25,000	17,500	23,000
Wilcoxon-W	54,000	47,000	28,000	53,000	45,500	51,000
Z	-,231	-1,042	-3,240	-,347	-1,737	-,743
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,817	,298	,001	,728	,082	,458
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,867(a)	,336(a)	,000(a)	,779(a)	,232(a)	,613(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	602020	7
	GB 14	8
	Gesamt	15
Osteoid/Os [%]	602020	7
	GB 14	8
	Gesamt	15
Kont_Be_Os [%]	602020	7
	GB 14	8
	Gesamt	15
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	7
	GB 14	8
	Gesamt	15
Kont_Met_Os [%]	602020	7
	GB 14	8
	Gesamt	15
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	7
	GB 14	8
	Gesamt	15

Statistik für Test(a)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_ Osteoid [%]	Kont_Met _Os [%]	Kont_Met_ Osteoid [%]
Extremste Absolut Differenzen	,304	,446	1,000	,286	,375	,232
Positiv	,196	,054	,000	,196	,000	,143
Negativ	-,304	-,446	-1,000	-,286	-,375	-,232
Kolmogorov-Smirnov-Z	,587	,863	1,932	,552	,725	,449
Asymptotische Signifi- kanz (2-seitig)	,882	,446	,001	,921	,670	,988

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich 602020 und GB14: 4 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	602020	8	6,25	50,00
	GB 14	8	10,75	86,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	602020	8	11,88	95,00
	GB 14	8	5,13	41,00
	Gesamt	16		
Kont_Be_Os [%]	602020	8	4,50	36,00
	GB 14	8	12,50	100,00
	Gesamt	16		
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8	11,75	94,00
	GB 14	8	5,25	42,00
	Gesamt	16		
Kont_Met_Os [%]	602020	8	5,00	40,00
	GB 14	8	12,00	96,00
	Gesamt	16		
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8	7,31	58,50
	GB 14	8	9,69	77,50
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Mann-Whitney-U	14,000	5,000	,000	6,000	4,000	22,500
Wilcoxon-W	50,000	41,000	36,000	42,000	40,000	58,500
Z	-1,890	-2,836	-3,361	-2,731	-3,240	-1,066
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,059	,005	,001	,006	,001	,287
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,065(a)	,003(a)	,000(a)	,005(a)	,002(a)	,328(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Osteoid/Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Be_Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Met_Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,500	,750	1,000	,750	,875	,375
	Positiv	,500	,000	1,000	,000	,875	,375
	Negativ	,000	-,750	,000	-,750	,000	-,125
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,000	1,500	2,000	1,500	1,750	,750
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,270	,022	,001	,022	,004	,627

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich 602020 und GB14: 6 Wochen

25.10. 2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	602020	8	11,75	94,00
	GB 14	8	5,25	42,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	602020	8	10,38	83,00
	GB 14	8	6,63	53,00
	Gesamt	16		
Kont_Be_Os [%]	602020	8	4,75	38,00
	GB 14	8	12,25	98,00
	Gesamt	16		
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8	12,50	100,00
	GB 14	8	4,50	36,00
	Gesamt	16		
Kont_Met_Os [%]	602020	8	7,69	61,50
	GB 14	8	9,31	74,50
	Gesamt	16		
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8	8,88	71,00
	GB 14	8	8,13	65,00
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Mann-Whitney-U	6,000	17,000	2,000	,000	25,500	29,000
Wilcoxon-W	42,000	53,000	38,000	36,000	61,500	65,000
Z	-2,731	-1,575	-3,151	-3,361	-,688	-,323
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,006	,115	,002	,001	,492	,746
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,005(a)	,130(a)	,001(a)	,000(a)	,505(a)	,798(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Osteoid/Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Be_Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Met_Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,875	,500	,875	1,000	,250	,375
	Positiv	,000	,000	,875	,000	,250	,250
	Negativ	-,875	-,500	,000	-1,000	-,125	-,375
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,750	1,000	1,750	2,000	,500	,750
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,004	,270	,004	,001	,964	,627

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich 602020 und GB14: 12 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	602020	8	9,88	79,00
	GB 14	7	5,86	41,00
	Gesamt	15		
Osteoid/Os [%]	602020	8	11,50	92,00
	GB 14	7	4,00	28,00
	Gesamt	15		
Kont_Be_Os [%]	602020	8	4,88	39,00
	GB 14	7	11,57	81,00
	Gesamt	15		
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8	11,50	92,00
	GB 14	7	4,00	28,00
	Gesamt	15		
Kont_Met_Os [%]	602020	8	5,00	40,00
	GB 14	7	11,43	80,00
	Gesamt	15		
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8	11,00	88,00
	GB 14	7	4,57	32,00
	Gesamt	15		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Mann-Whitney-U	13,000	,000	3,000	,000	4,000	4,000
Wilcoxon-W	41,000	28,000	39,000	28,000	40,000	32,000
Z	-1,736	-3,240	-2,893	-3,240	-2,777	-2,780
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,083	,001	,004	,001	,005	,005
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,094(a)	,000(a)	,002(a)	,000(a)	,004(a)	,004(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	602020	8
	GB 14	7
	Gesamt	15
Osteoid/Os [%]	602020	8
	GB 14	7
	Gesamt	15
Kont_Be_Os [%]	602020	8
	GB 14	7
	Gesamt	15
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	7
	Gesamt	15
Kont_Met_Os [%]	602020	8
	GB 14	7
	Gesamt	15
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	7
	Gesamt	15

Statistik für Test(a)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Extremste Absolut Differenzen	,482	1,000	,875	1,000	,750	,875
Positiv	,000	,000	,875	,000	,750	,000
Negativ	-,482	-1,000	,000	-1,000	,000	-,875
Kolmogorov-Smirnov-Z	,932	1,932	1,691	1,932	1,449	1,691
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,351	,001	,007	,001	,030	,007

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich 602020 und GB14: 24 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	602020	8	12,25	98,00
	GB 14	8	4,75	38,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	602020	8	9,06	72,50
	GB 14	8	7,94	63,50
	Gesamt	16		
Kont_Be_Os [%]	602020	8	6,88	55,00
	GB 14	8	10,13	81,00
	Gesamt	16		
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8	11,63	93,00
	GB 14	8	5,38	43,00
	Gesamt	16		
Kont_Met_Os [%]	602020	8	9,38	75,00
	GB 14	8	7,63	61,00
	Gesamt	16		
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8	10,63	85,00
	GB 14	8	6,38	51,00
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Mann-Whitney-U	2,000	27,500	19,000	7,000	25,000	15,000
Wilcoxon-W	38,000	63,500	55,000	43,000	61,000	51,000
Z	-3,151	-,473	-1,365	-2,626	-,735	-1,785
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,636	,172	,009	,462	,074
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,001(a)	,645(a)	,195(a)	,007(a)	,505(a)	,083(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Osteoid/Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Be_Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Be_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Met_Os [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16
Kont_Met_Osteoid [%]	602020	8
	GB 14	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont_Be_Os [%]	Kont_Be_Osteoid [%]	Kont_Met_Os [%]	Kont_Met_Osteoid [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,875	,500	,375	,875	,250	,500
	Positiv	,000	,250	,375	,000	,125	,000
	Negativ	-,875	-,500	,000	-,875	-,250	-,500
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,750	1,000	,750	1,750	,500	1,000
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,004	,270	,627	,004	,964	,270

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich FA-CZP und HA: 2 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	FA-CZP	8	7,88	63,00
	HA	16	14,81	237,00
	Gesamt	24		
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8	20,25	162,00
	HA	16	8,63	138,00
	Gesamt	24		
Kont [%]	FA-CZP	8	4,50	36,00
	HA	16	16,50	264,00
	Gesamt	24		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	27,000	2,000	,000
Wilcoxon-W	63,000	138,000	36,000
Z	-2,266	-3,797	-3,919
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,023	,000	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,023(a)	,000(a)	,000(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	FA-CZP	8
	HA	16
	Gesamt	24
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8
	HA	16
	Gesamt	24
Kont [%]	FA-CZP	8
	HA	16
	Gesamt	24

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,500	,938	1,000
	Positiv	,000	,938	,000
	Negativ	-,500	,000	-1,000
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,155	2,165	2,309
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,139	,000	,000

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich FA-CZP und HA: 4 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	FA-CZP	8	13,00	104,00
	HA	15	11,47	172,00
	Gesamt	23		
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8	19,38	155,00
	HA	15	8,07	121,00
	Gesamt	23		
Kont [%]	FA-CZP	8	4,50	36,00
	HA	15	16,00	240,00
	Gesamt	23		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	52,000	1,000	,000
Wilcoxon-W	172,000	121,000	36,000
Z	-,516	-3,808	-3,873
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,606	,000	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,636(a)	,000(a)	,000(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	FA-CZP	8
	HA	15
	Gesamt	23
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8
	HA	15
	Gesamt	23
Kont [%]	FA-CZP	8
	HA	15
	Gesamt	23

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,342	,933	1,000
	Positiv	,342	,933	,000
	Negativ	-,200	,000	-1,000
Kolmogorov-Smirnov-Z		,780	2,132	2,284
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,576	,000	,000

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich FA-CZP und HA: 6 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	FA-CZP	8	14,88	119,00
	HA	16	11,31	181,00
	Gesamt	24		
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8	20,50	164,00
	HA	16	8,50	136,00
	Gesamt	24		
Kont [%]	FA-CZP	8	4,88	39,00
	HA	16	16,31	261,00
	Gesamt	24		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	45,000	,000	3,000
Wilcoxon-W	181,000	136,000	39,000
Z	-1,164	-3,920	-3,735
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,245	,000	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,264(a)	,000(a)	,000(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	FA-CZP	8
	HA	16
	Gesamt	24
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8
	HA	16
	Gesamt	24
Kont [%]	FA-CZP	8
	HA	16
	Gesamt	24

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,500	1,000	,875
	Positiv	,500	1,000	,000
	Negativ	-,125	,000	-,875
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,155	2,309	2,021
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,139	,000	,001

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich FA-CZP und HA: 12 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	FA-CZP	8	13,88	111,00
	HA	13	9,23	120,00
	Gesamt	21		
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8	17,50	140,00
	HA	13	7,00	91,00
	Gesamt	21		
Kont [%]	FA-CZP	8	4,50	36,00
	HA	13	15,00	195,00
	Gesamt	21		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	29,000	,000	,000
Wilcoxon-W	120,000	91,000	36,000
Z	-1,666	-3,766	-3,766
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,096	,000	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,104(a)	,000(a)	,000(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	FA-CZP	8
	HA	13
	Gesamt	21
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8
	HA	13
	Gesamt	21
Kont [%]	FA-CZP	8
	HA	13
	Gesamt	21

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,615	1,000	1,000
	Positiv	,615	1,000	,000
	Negativ	-,154	,000	-1,000
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,369	2,225	2,225
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,047	,000	,000

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich FA-CZP und HA: 24 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	FA-CZP	8	18,00	144,00
	HA	15	8,80	132,00
	Gesamt	23		
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8	19,50	156,00
	HA	15	8,00	120,00
	Gesamt	23		
Kont [%]	FA-CZP	8	4,50	36,00
	HA	15	16,00	240,00
	Gesamt	23		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	12,000	,000	,000
Wilcoxon-W	132,000	120,000	36,000
Z	-3,098	-3,873	-3,873
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,000	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,001(a)	,000(a)	,000(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	FA-CZP	8
	HA	15
	Gesamt	23
Osteoid/Os [%]	FA-CZP	8
	HA	15
	Gesamt	23
Kont [%]	FA-CZP	8
	HA	15
	Gesamt	23

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,750	1,000	1,000
	Positiv	,750	1,000	,000
	Negativ	,000	,000	-1,000
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,713	2,284	2,284
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,006	,000	,000

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich Ca4Ti3O10 und Ti6Al4V: 2 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8	11,63	93,00
	Titan II	8	5,38	43,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8	5,63	45,00
	Titan II	8	11,38	91,00
	Gesamt	16		
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8	9,63	77,00
	Titan II	8	7,38	59,00
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	7,000	9,000	23,000
Wilcoxon-W	43,000	45,000	59,000
Z	-2,626	-2,415	-,945
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,009	,016	,345
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,007(a)	,015(a)	,382(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,625	,750	,375
	Positiv	,000	,750	,000
	Negativ	-,625	,000	-,375
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,250	1,500	,750
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,088	,022	,627

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich Ca4Ti3O10 und Ti6Al4V: 4 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8	9,50	76,00
	Titan II	8	7,50	60,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8	8,00	64,00
	Titan II	8	9,00	72,00
	Gesamt	16		
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8	8,25	66,00
	Titan II	8	8,75	70,00
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	24,000	28,000	30,000
Wilcoxon-W	60,000	64,000	66,000
Z	-,840	-,420	-,210
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,401	,674	,834
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,442(a)	,721(a)	,878(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	Ca4Ti3O	8
	10	
	Titan II	8
	Gesamt	16
OSTE- OID/OS [%]	Ca4Ti3O	8
	10	
	Titan II	8
	Gesamt	16
Kont [%]	Ca4Ti3O	8
	10	
	Titan II	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,375	,250	,375
	Positiv	,250	,250	,375
	Negativ	-,375	-,125	-,250
Kolmogorov-Smirnov-Z		,750	,500	,750
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,627	,964	,627

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich Ca4Ti3O10 und Ti6Al4V: 6 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8	7,00	56,00
	Titan II	6	8,17	49,00
	Gesamt	14		
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8	9,13	73,00
	Titan II	6	5,33	32,00
	Gesamt	14		
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8	6,75	54,00
	Titan II	6	8,50	51,00
	Gesamt	14		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	20,000	11,000	18,000
Wilcoxon-W	56,000	32,000	54,000
Z	-,516	-1,678	-,775
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,606	,093	,439
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,662(a)	,108(a)	,491(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	Ca4Ti3O	8
	10	
	Titan II	6
	Gesamt	14
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O	8
	10	
	Titan II	6
	Gesamt	14
Kont [%]	Ca4Ti3O	8
	10	
	Titan II	6
	Gesamt	14

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,250	,542	,333
	Positiv	,250	,000	,333
	Negativ	-,125	-,542	-,167
Kolmogorov-Smirnov-Z		,463	1,003	,617
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,983	,267	,841

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich Ca4Ti3O10 und Ti6Al4V: 12 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8	7,75	62,00
	Titan II	8	9,25	74,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8	10,13	81,00
	Titan II	8	6,88	55,00
	Gesamt	16		
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8	9,38	75,00
	Titan II	8	7,63	61,00
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	26,000	19,000	25,000
Wilcoxon-W	62,000	55,000	61,000
Z	-,630	-1,365	-,735
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,529	,172	,462
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,574(a)	,195(a)	,505(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,250	,500	,375
	Positiv	,250	,125	,125
	Negativ	-,125	-,500	-,375
Kolmogorov-Smirnov-Z		,500	1,000	,750
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,964	,270	,627

a Gruppenvariable: Implantat

Vergleich Ca4Ti3O10 und Ti6Al4V: 24 Wochen

25.10.2004

Mann-Whitney-Test

Ränge

	Implantat	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BV/TV [%]	Ca4Ti3O10	8	12,25	98,00
	Titan II	8	4,75	38,00
	Gesamt	16		
Osteoid/Os [%]	Ca4Ti3O10	8	9,38	75,00
	Titan II	8	7,63	61,00
	Gesamt	16		
Kont [%]	Ca4Ti3O10	8	11,63	93,00
	Titan II	8	5,38	43,00
	Gesamt	16		

Statistik für Test(b)

	BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Mann-Whitney-U	2,000	25,000	7,000
Wilcoxon-W	38,000	61,000	43,000
Z	-3,151	-,735	-2,626
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,002	,462	,009
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,001(a)	,505(a)	,007(a)

a Nicht für Bindungen korrigiert.

b Gruppenvariable: Implantat

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Implantat	N
BV/TV [%]	Ca4Ti3O 10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16
Oste- oid/Os [%]	Ca4Ti3O 10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16
KONT [%]	Ca4Ti3O 10	8
	Titan II	8
	Gesamt	16

Statistik für Test(a)

		BV/TV [%]	Osteoid/Os [%]	Kont [%]
Extremste Differenzen	Absolut	,875	,500	,625
	Positiv	,000	,250	,000
	Negativ	-,875	-,500	-,625
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,750	1,000	1,250
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,004	,270	,088

a Gruppenvariable: Implantat